

CONSTRUCTION D'UN VIRUS MYXOMATEUX DELETE DE LA PROTEINE D'ENVELOPPE MO22L

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Séverine, Stéphanie, Elisabeth SAMPIETRO

Née, le 13 octobre 1975 à SAINT-JEAN-D'ANGELY (Charente Maritime)

Directeur de thèse : M. le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :
M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Stéphane BERTAGNOLI
M. Jean-Luc GUERIN

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	R. LAUTIE
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAUX
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
Mlle **HAY Magali**, *Zootéchnie*
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

M. **GRANDJEAN Christophe**, *Gestion de la santé en élevage des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

Remerciements :

A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT,

Professeur des Universités,

Praticien hospitalier,

Bactériologie-Virologie,

Qui nous a fait l' honneur d' accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI,

Maître de conférences de l' Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie infectieuse,

Qui nous a fait l' honneur de superviser ce travail,

*Une très grande reconnaissance pour toute sa gentillesse, sa disponibilité et.....son
innommable patience.*

A Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN,

Maître de conférences de l' Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Productions Animales,

Qui nous fait l' honneur de participer à notre jury de thèse,

Sincères remerciements.

Dédicaces :

A ma Maman,

Qui a toujours été très présente, lors des bons moments, comme dans les coups durs. Sans elle, tout son Amour et ses bons conseils, je ne serai jamais arrivée là où je suis.

A Papa,

Qui m' a sans cesse soutenu et orienté vers l' essentiel. Que l' aboutissement de ce travail soit le reflet de tout notre Amour et de mon entière reconnaissance.

A mon Canari,

Je te dois beaucoup et t' offre mon cœur.

A Domie,

Merci de m' avoir accepté telle que je suis. Merci pour tout.

A mes grands parents,

Vous avez toujours été là pour me soutenir tout au long de mes études et encore maintenant. Merci pour tous ces souvenirs d' enfance inoubliables et merveilleux.

A Julien, Julie, Jérôme, et matthieu,

Je vous adore.

A mes copines pour de vrai : Anneuh-laureeeuh, Laurette, la crep' et Virginie,

A Christophe,

A toutes les personnes qui sont ou ont été à mes cotés :

Gisèle et michel, Roldolphe, Gilles et Ghislaine, Agnès, Agnès et Bernt, Pierre, Caro, Myriam, Marie-Luce, et tous les autres....

A Nani.

TABLE DES MATIERES :

INTRODUCTION	19
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
I-La myxomatose	23
1-Historique et répartition géographique	23
a-Historique	23
b-Répartition géographique	27
2-Clinique	29
a-Symptômes	29
<i>Forme classique</i>	29
-Forme aiguë	29
-Forme subaiguë	31
-Forme bénigne	31
<i>Forme amyxomateuse</i>	31
b-Les lésions	33
3-Epidémiologie	35
a-Epidémiologie descriptive	35
b-Epidémiologie analytique	37
c-Epidémiologie synthétique	39
4-Pathogénie	41
5-Réponse immunitaire antipoxvirale de l' hôte	45
a-Réponse immunitaire non spécifique	47
b-Réponse immunitaire spécifique anti poxvirale	51
c-Conclusion	51
II-Les poxvirus et le modèle virus de la vaccine	53
1-Les poxvirus : Morphologie et structure	53
a-Généralités	53
b-Morphologie et structure des poxvirus	57
2-Cycle viral des poxvirus	67

3-Les deux formes infectieuses IMV et EEV	73
a-Généralités	73
b-Caractéristiques des deux formes infectieuses	75
<i>Propriétés morphologiques</i>	75
<i>Propriétés physico-chimiques</i>	75
<i>Propriétés biologiques</i>	77
c-Formation des deux formes infectieuses	89
 DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE	 95
 Introduction	 97
 I-Matériel et méthodes	 99
1-Cellules, plasmides et sérums utilisés	99
2-Cultures des bactéries	99
3-Electrophorèse horizontale d' ADN	101
4-Amplification par polymérisation en chaîne (PCR)	101
5-Préparation d' ADN plasmidique	105
a-Préparation d' ADN par miniprep	105
b-Préparation d' ADN en grand volume sur colonne Qiagen	105
6-Construction d' un ADN recombiné	107
a-Digestion d' ADN plasmidique	107
b-Ligation	109
7-Préparation de bactéries compétentes	111
8-Transformation	111
9-Transfection	111
a-Formation des complexes ADN-liposomes	111
b-Transfection proprement dite	113
10-Immunofluorescence	113
a-Fixation des cellules	113
b-Révélation par immunofluorescence	115
11-Construction et sélection des virus mutants	115
12-Extraction d' ADN viral	117
13-Immunisation des lapins	117

II-Résultats	117
1-Construction des plasmides	117
a-Plasmide de transfert	119
b-Plasmide d' expression	123
2-Construction du virus mutant Mo22L-	123
a-Schéma général de recombinaison	125
b-Obtention de plages fluorescentes	127
c-Vérification des plages sélectionnées	127
3-Obtention d' un sérum spécifique de MO22L	131
a-Résultat de la transfection simple	131
b-Immunisation des lapins : obtention d' un sérum spécifique	131
 III-Discussion-conclusion	 135
 Liste des annexes	 141
Page des signatures	161
Bibliographies	163

Table des illustrations :

Fig 1 : Extrait du journal « la chasse et la pêche » datant du 16 juillet 1953.	25
Fig 2 : Cycle épidémiologique de la myxomatose en plein air.	41
Fig 3 : Vue en microscopie électronique du virus de la vaccine.	57
Fig 4 : Section fine (microscopie électronique) du virus de la vaccine.	59
Fig 5 : Vue schématique d' un orthopoxvirus.	61
Fig 6 : Génome du virus de la vaccine (schéma).	65
Fig 7 : Cycle de réplication du virus de la vaccine.	67
Fig 8 : Modèle d' entrée du virus de la vaccine.	85
Fig 9 : Morphogénèse des particules IMV et EEV.	91
Fig 10 : Carte de restriction du plasmide pGEMT-MO22L.	118
Fig 11 : Construction du plasmide de transfert pGEMT-MO22L-GFP.	120
Fig 12 : Carte de restriction du plasmide d' expression.	121
Fig 13 : Construction du virus mutant MO22L-.	125
Fig 14 : Vérification de la présence et de la pureté du mutant recombinant par PCR.	129
 Carte 1 : Evolution de la répartition géographique de la myxomatose dans le monde.	 27
 Photo 1 : Lapin atteint de la forme classique de myxomatose.	 29
Photo 2 : Lapin atteint de la forme amyxomateuse de myxomatose.	33
Photo 3 : Photographie de fluorescence en microscopie.	127
 Tableau 1 : Infectiosité expérimentale comparée de souches européennes et californienne de virus myxomateux in vivo.	 43
Tableau 2 : Poxvirus des vertébrés.	55

INTRODUCTION :

La myxomatose est une maladie infectieuse, contagieuse et transmissible touchant essentiellement le lapin européen. De nos jours, elle sévit encore sur quatre continents. Elle se caractérise par des myxomes et des signes respiratoires liés à une forte immunodépression viro-induite. Elle est provoquée par un poxvirus du genre *Leporipoxvirus*.

Les poxvirus possèdent deux formes virales infectieuses différentes, ce qui leur confère toute leur originalité. Ces deux formes sont les IMV et les EEV et possèdent des propriétés très différentes.

L'étude du virus myxomateux est intéressante dans la mesure où le lapin est non seulement un modèle spontané de la maladie, mais c'est aussi un animal de laboratoire. Ceci permet donc de valider directement les recherches et d'éclairer les relations virus-hôte par la possibilité de l'étude *in vivo* en plus de l'étude *in vitro*.

Ainsi, pour pouvoir étudier distinctement chacune des deux populations virales, nous avons procédé à une mutagénèse dirigée afin de produire uniquement une seule des deux populations. Nous avons réalisé une mutation sur le gène de structure (protéine EEV) MO22L pour ne plus avoir d'EEV.

Notre étude se composera d'une étude bibliographique, rappelant les différents travaux déjà existants, puis d'une étude expérimentale développant notre démarche dans la mutagénèse.

PREMIERE PARTIE :

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

I- La myxomatose

1- Historique et répartition géographique :

a- Historique :

C'est en 1896 que Sanarelli, dans son laboratoire de Montevideo (Uruguay), décrit pour la première fois la myxomatose sur des lapins de laboratoire qu'il avait importés du Brésil. Certains de ces lapins furent touchés par une maladie très contagieuse n'affectant aucun autre animal et qui aboutissait à la mort inéluctable en 14 jours. Il décida d'appeler cette maladie «myxomatose», du grec *muxa*, mucus et *oma*, tumeur (SANARELLI, 1898).

Le 15 janvier 1919, dans une lettre adressée au directeur de l'institut australien de médecine tropicale, le Dr Beaurepaire Aragao de l'institut Oswald Cruz situé à Rio de Janeiro a été le premier à suggérer l'utilisation du virus myxomateux pour lutter contre la pullulation des lapins en Australie. En 1927, Aragao met en évidence pour la première fois, la ressemblance étroite entre le virus myxomateux et les autres membres de la famille des *Poxviridae*, tels que les virus de la vaccine, de la variole ou du fowlpox.

Durant l'hiver 1950, le virus myxomateux a été testé comme moyen de lutte en Australie dans la vallée de Murray au niveau de cinq sites normalement isolés. C'est cette expérience qui est à l'origine de l'apparition et de l'extension de la myxomatose en Australie dès le printemps 1952. Cette extension est due à l'existence de vecteurs passifs, les moustiques, dont le rôle dans la transmission de la maladie était jusqu'alors inconnu.

La myxomatose a été introduite en France par le Dr Louis Armand Delille, dans sa propriété d'Eure et Loire en juin 1952, à partir d'un lapin illégalement importé. (Voir Fig 1). Elle a été décrite pour la première fois en octobre 1952.

Dès 1953, on la retrouve dans les principaux pays d'Europe. En 1957, elle était répandue sur tout le territoire français. Elle envahit ensuite toute l'Europe.



LA CHASSE ET LA PÊCHE

RUBRIQUE HEBDOMADAIRE PARAISSANT LE MERCREDI



La myxomatose sévit dans 20 départements

Elle aurait été introduite en France par un propriétaire imprudent, mais aucune enquête n'a encore été ouverte

par Marc LAMBERT

LE 15 janvier dernier, « France-soir » annonçait qu'une grave maladie du lapin de garenne, la myxomatose, était apparue en France. Nous écrivions alors qu'on ne disposait d'aucun moyen pour enrayer le mal et qu'on pouvait craindre que l'épizootie s'étendît sur l'ensemble du territoire.

Les faits nous ont hélas donné raison. Aujourd'hui, la myxomatose exerce des ravages dans une vingtaine de départements.

Chaque jour, de nouvelles contrées sont atteintes et on peut craindre que d'ici l'ouverture, la situation s'aggrave encore, la contagion étant facilitée l'été par un porteur de germe : le moustique.

L'Institut Pasteur a mis au point un vaccin qui, inoculé à la dose d'un demi-centimètre cube, donne une immunité relative. Mais il est bien évident que la vaccination, si elle peut sauver les lapins de clapier, restera inopérante pour le lapin de garenne.

Bref, il faut en prendre son par-

ti : cet hiver, dans bien des forêts, dans bien des landes, on ne verra plus Jeannot-lapin.

Sa disparition, pour de nombreux chasseurs, dont il était le gibier de base, est déjà catastrophique. Mais que dire des cartoucheries, des armuriers ? La vente des cartouches à lapins représentait 80 % du chiffre d'affaires des fabricants de munitions. Plus de lapins, et de nombreuses maisons vont être mises dans une situation difficile.

En fait, l'épidémie de myxomatose a des effets qui débordent le cadre de la chasse.

C'est pourquoi il serait temps que les pouvoirs publics s'intéressent de plus près à la question.

D'où vient la maladie ?

Quand l'épizootie apparut, la première question que les chasseurs se posèrent fut celle-ci :

— Comment la maladie a-t-elle pu être amenée en France ?

Jamais la myxomatose n'avait sévi en Europe. Elle n'était connue qu'en Amérique du Sud, où elle existe à l'état endémique et en Australie, où on l'avait « importée » pour détruire les lapins.

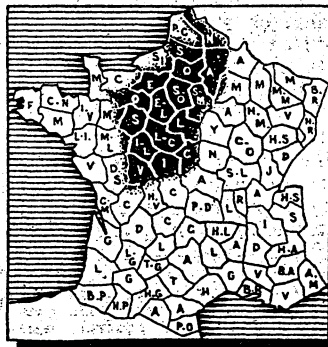
Comment, en effet, la myxomatose s'est-elle répandue en France ?

Sept mois après, la question n'a pas encore reçu une réponse officielle.

Certaines rumeurs commencent à circuler dans les milieux cynégétiques. On raconte que le fléau se-

rait né de l'imprudence d'un propriétaire. Celui-ci, las d'avoir à payer des dégâts de lapins aurait inoculé le virus de Sanarelli à quelques sujets. Comme l'apprenti-sorcier il aurait été impuissant à juguler le mal qu'il aurait fait naître. Les lapins contaminés auraient porté le virus dans des propriétés voisines et c'est ainsi que l'épizootie se serait étendue.

Les rumeurs précisent que c'est en Eure-et-Loir, près de Chartres, que le premier foyer de la maladie se serait constitué. Elles donnent le



nom de l'apprenti-sorcier. Celui-ci serait le proche parent d'un personnage influent, ce qui expliquerait le silence observé jusqu'à présent par les services officiels.

Le silence des services « officiels »

Ces accusations — précisons-le — ne s'appuient sur aucune preuve. Mais il est surprenant qu'aucune enquête n'ait encore été ouverte. Le Conseil supérieur de la chasse, les fédérations de chasseurs n'hésitent pas le cas échéant à se porter partie civile contre de petits braconniers de village. Pourquoi font-ils preuve d'une telle réserve, d'une telle mansuétude, dans une affaire qui porte à la chasse française un coup mortel ?

Fig 1 : Extrait du journal « la chasse et la pêche » datant du 16 juillet 1953.

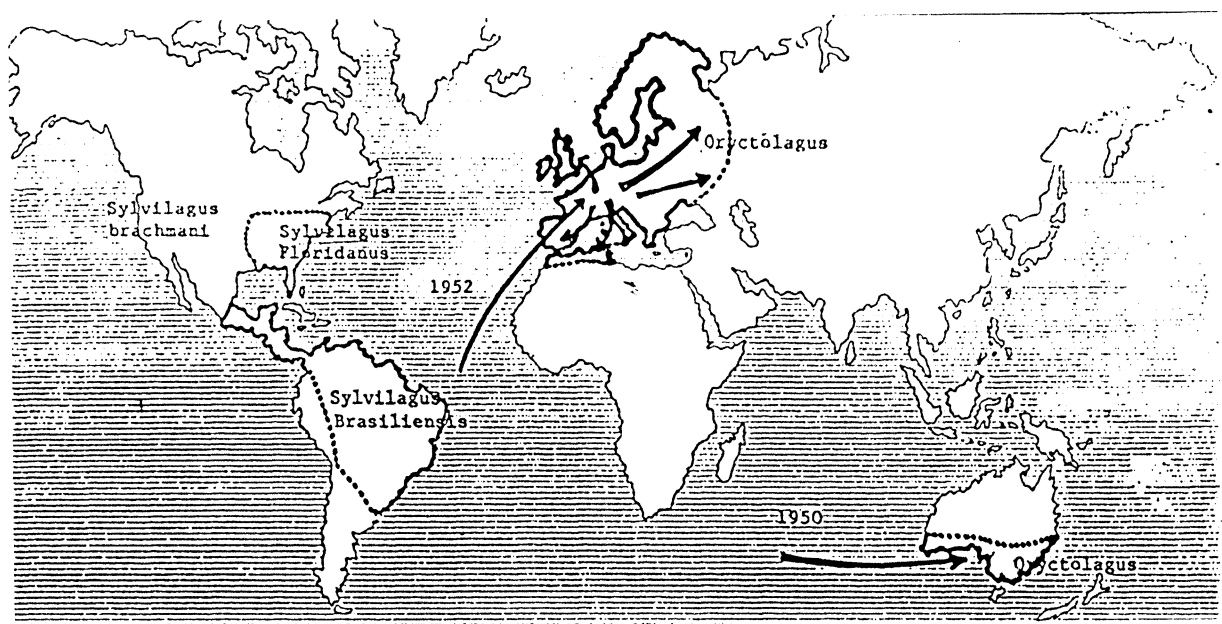
Depuis 1962, on a pu remarquer une diminution progressive de la fréquence des souches les plus virulentes parmi les souches virales isolées.

Enfin, c' est en 1980 que la forme amyxomateuse a été décrite pour la première fois (BRUN et al, 1981).

b- Répartition géographique :

Actuellement, le virus sévit en Europe, en Afrique du Nord, en Amérique du sud et en Australie.

La carte 1 représente l' évolution géographique de la myxomatose dans le monde.



Carte 1 : Evolution de la répartition géographique de la myxomatose dans le monde.

2- Clinique :

a- Symptômes :

♦ Forme classique (JOUBERT et al, 1972) :

Elle est caractérisée par l' apparition de myxomes. L' incubation va de deux jours à trois semaines, en moyenne six à dix jours.

◇ Forme aiguë :

La phase céphalique est caractérisée par l' apparition de myxomes primaires au point d' inoculation, souvent à la base des oreilles et autour des yeux. (Voir photo.1) On observe une blépharoconjonctivite plus ou moins importante avec du jetage assez abondant, ainsi qu' un œdème céphalique causé par des myxomes secondaires, ce qui donne un aspect léonin aux lapins myxomateux.

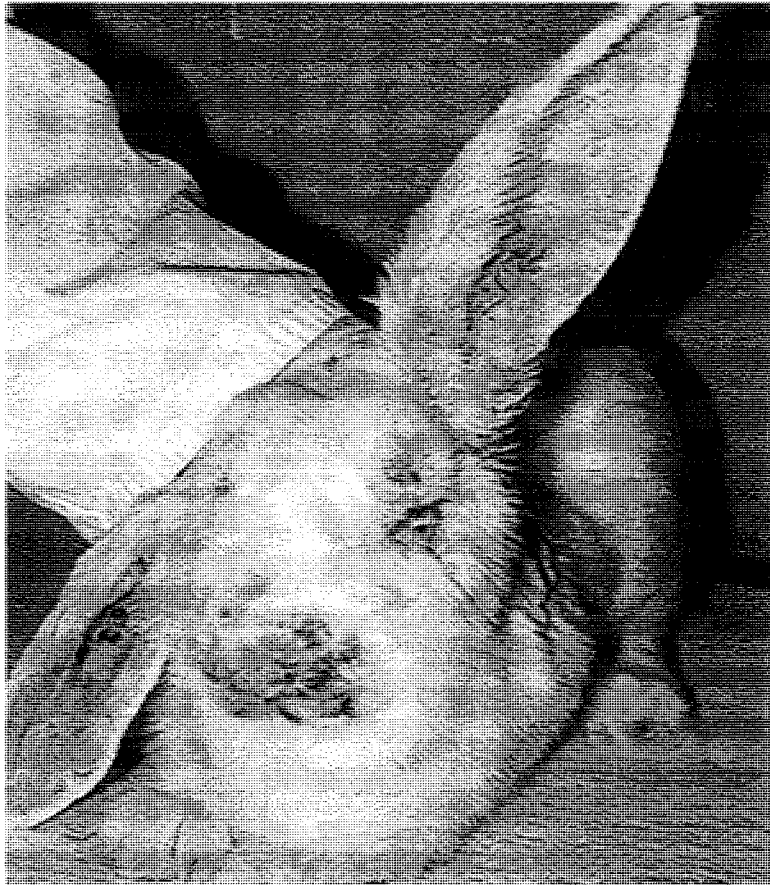


Photo 1 : Lapin atteint de la forme classique de myxomatose.

Cette phase dure entre trois jours et une semaine. A terme, l' animal n' a plus ni odorat ni appétit d' où un épuisement important.

La phase anogénitale commence trois à cinq jours après l' apparition des premiers symptômes. On observe des myxomes en région anogénitale, des oedèmes et des congestions. Les testicules sont hypertrophiés.

La phase terminale est caractérisée par l' envahissement de tout le corps par des myxomes cutanés secondaires. Ils sont froids, non douloureux et adhérents à la peau. En général, les noeuds lymphatiques correspondants sont hypertrophiés. L' évolution des lésions tend à l' exudation et l' ulcération. On note un amaigrissement extrême de l' animal. Les complications bactériennes sont le plus souvent de type respiratoire et conjonctival avec par exemple *Pasteurella multocida* et *Bordetella bronchiseptica*, celles-ci contribuant à la létalité de la maladie. On aboutit à la mort de l' animal par épuisement en environ quinze jours pour les souches les plus pathogènes.

◇ **Forme subaiguë :**

On a pratiquement le même tableau clinique, mais les symptômes sont atténués. Les myxomes sont moins nombreux et moins exudatifs, ils cicatrisent plus vite. L' évolution est plus lente (vingt à trente jours), et se termine soit par la mort de l' animal, soit par la guérison qui laisse des séquelles d' orchites ou d' ovarites.

◇ **Forme bénigne :**

Ce sont les souches très peu pathogènes qui entraînent cette forme. Les lésions sont alors localisées, peu exsudatives et autocurables. Les lapins présentent des nodules en petit nombre, surtout auriculaires et métatarsiens, rapidement surmontés d' une croûte. On a peu de myxomes secondaires et éventuellement quelques surinfections.

◆ **Forme amyxomateuse :** (Voir photo 2)

Les premiers cas ont été décrit en 1980 (BRUN et al, 1981). L' incubation dure de une à trois semaines. Il n' y a pas ou très peu de myxomes, comme le nom l' indique, mais une blépharoconjonctivite, du jetage et un exsudat oculaire muco-

purulent. On note une tuméfaction anogénitale ainsi qu' un œdème de la conque auriculaire discret. Les formes graves touchent surtout les jeunes, et les adultes sont affectés dans les élevages intensifs. On retrouve alors des troubles de la fertilité, des avortements et des abandons de portées. On retrouve dans cette forme, une forme aiguë et une forme subaiguë.



Photo 2 : Lapin atteint de la forme amyxomateuse de myxomatose.

b- Les lésions (PETIT, BERTAGNOLI ET BOUCRAUT-BARALON, 1997):

La lésion macroscopique principale est le myxome. C' est une pseudo tumeur cutanée adhérente à la peau. Le tissu est lisse, homogène, brillant, rose ou rouge et plus ou moins exsudatif (en fonction du pouvoir pathogène de la souche). On a également une congestion des organes : poumons, foie, nœuds lymphatiques. La rate est réactionnelle. Les nœuds lymphatiques sont hypertrophiés.

D ' un point de vue microscopique, les pseudotumeurs cutanées consistent en une prolifération de cellules mésenchymateuses non différenciées, appelées cellules myxomateuses. Elles ressemblent à des fibroblastes rameux, étoilés, très volumineux, comprenant de nombreuses déformations nucléaires. On peut aussi observer une prolifération des cellules endothéliales des capillaires et veinules des tissus environnants, souvent jusqu' au point où une occlusion complète mène à une nécrose du site infecté. Localement, les cellules épithéliales peuvent montrer une hyperplasie, ou une dégénérescence, selon la souche virale. Des corps d' inclusion spécifiques (corps de Splendore) sont fréquemment observés dans le cytoplasme des cellules infectées.

Les muqueuses au voisinage des myxomes secondaires subissent une métaplasie squameuse telle que les épithéliums deviennent non ciliés et se kératinisent. La destruction de l' architecture ciliaire peut être un des facteurs qui facilitent les surinfections bactériennes massives à germes à Gram négatif des yeux, du nez et du tractus respiratoire. L' infiltration des lésions par les cellules de l' inflammation a lieu à des degrés divers peu de temps après l' infection. Les nœuds lymphatiques et la rate sont réactionnels et le virus infectieux peut être isolé à partir de tous les organes lymphoïdes, sauf le thymus (PETIT, BERTAGNOLI ET BOUCRAUT-BARALON 1997).

3- Epidémiologie :

a- Epidémiologie descriptive :

Les espèces affectées par la myxomatose sont les lagomorphes, et plus précisément le lapin européen *Oryctolagus cuniculus* qui est la cible privilégiée. Le lièvre européen *Lepus europeus* peut présenter des symptômes mais ceci reste beaucoup plus rare (JOUBERT et al, 1972).

Le réservoir viral est constitué des lapins américains (*Sylvilagus*) qui sont des porteurs asymptomatiques. Leur importation est interdite en France.

Actuellement, le virus myxomateux sévit en Europe, en Afrique du Nord, en Amérique du sud et en Australie. En Europe, cette maladie pose de nombreux

problèmes économiques et sociologiques (en particulier les chasseurs sont nombreux en France et se plaignent de la réduction des populations de lapins de garenne).

Evolution dans le temps : il faut discerner deux types d' évolutions. On a d' une part, les lapins de garenne et ceux des élevages traditionnels, chez qui la myxomatose émerge sous forme épizootique en période estivo-automnale (ARTHUR, 1989). On a trois pics au cours de l' année . Le pic estival est le plus important. La morbidité dépend alors de la quantité de vecteurs présents et la mortalité est liée à la proportion de jeunes qui ne sont pas encore immunisés correctement. Le deuxième pic se situe à la fin de l' automne. La propagation est à ce moment là plus faible car la transmission se fait dans les terriers par les puces ou par contact direct. Au pic printanier, la transmission se fait par les puces. Les variations annuelles de la myxomatose en milieu naturel dépendent essentiellement de deux facteurs : les conditions climatiques (pullulation des moustiques), et les souches virales. On a parfois aussi une petite circulation du virus chez les lapins de garenne en hiver. D' autre part, dans les élevages intensifs, on peut assister à une apparition de symptômes souvent frustes tous les trois ou quatre mois. Quelle que soit la saison, la myxomatose suit le cycle maternité-engraissement-maternité... On ne comprend d' ailleurs pas comment la maladie peut sévir si régulièrement dans ces élevages où les mesures sanitaires sont très strictes. La seule explication serait l' existence d' un portage latent du virus myxomateux chez les adultes, en particulier les mâles. Or, la plupart des poxvirus n' induit pas d' infections persistantes. Néanmoins, certains auteurs rapportent la possibilité de portage sain de virus myxomateux au niveau des gonades (MARLIER et al, 2000), ce qui pourrait constituer une source virale occulte.

b- Epidémiologie analytique : (Voir Fig 2).

Les sources de virus sont :

- les animaux malades, ceci via les myxomes et le jetage oculo-nasal,
- les cadavres qui peuvent être virulents pendant plus de dix mois,

- les lapins sylvilagus porteurs sains en Amérique,
- les arthropodes en quiescence ou en diapause peuvent héberger le virus et ainsi servir de réservoir,
- les sols des terriers sembleraient être source de contamination,
- le sperme pourrait être source de virus.

La transmission se fait essentiellement par l'intermédiaire d'arthropodes vecteurs (puces, moustiques, simulidés). Ce sont des vecteurs passifs car la transmission est purement mécanique. Dans ce cas, la voie d'inoculation majeure est la voie intradermique (FENNER ET RATCLIFFE, 1965). Elle peut également se faire par contact direct ou indirect (voie aérogène).

c- Epidémiologie synthétique :

Le cycle classique est de type saisonnier de plein air. .voir Fig. On assiste le plus souvent à une atteinte des lapins de garenne plutôt estivale, suivie d'une atteinte des lapins de clapier plutôt automnale. Ce cycle suit la dynamique des populations de vecteurs.

Il existe également des formes confinées à cycle non expliqués, en élevage intensifs.

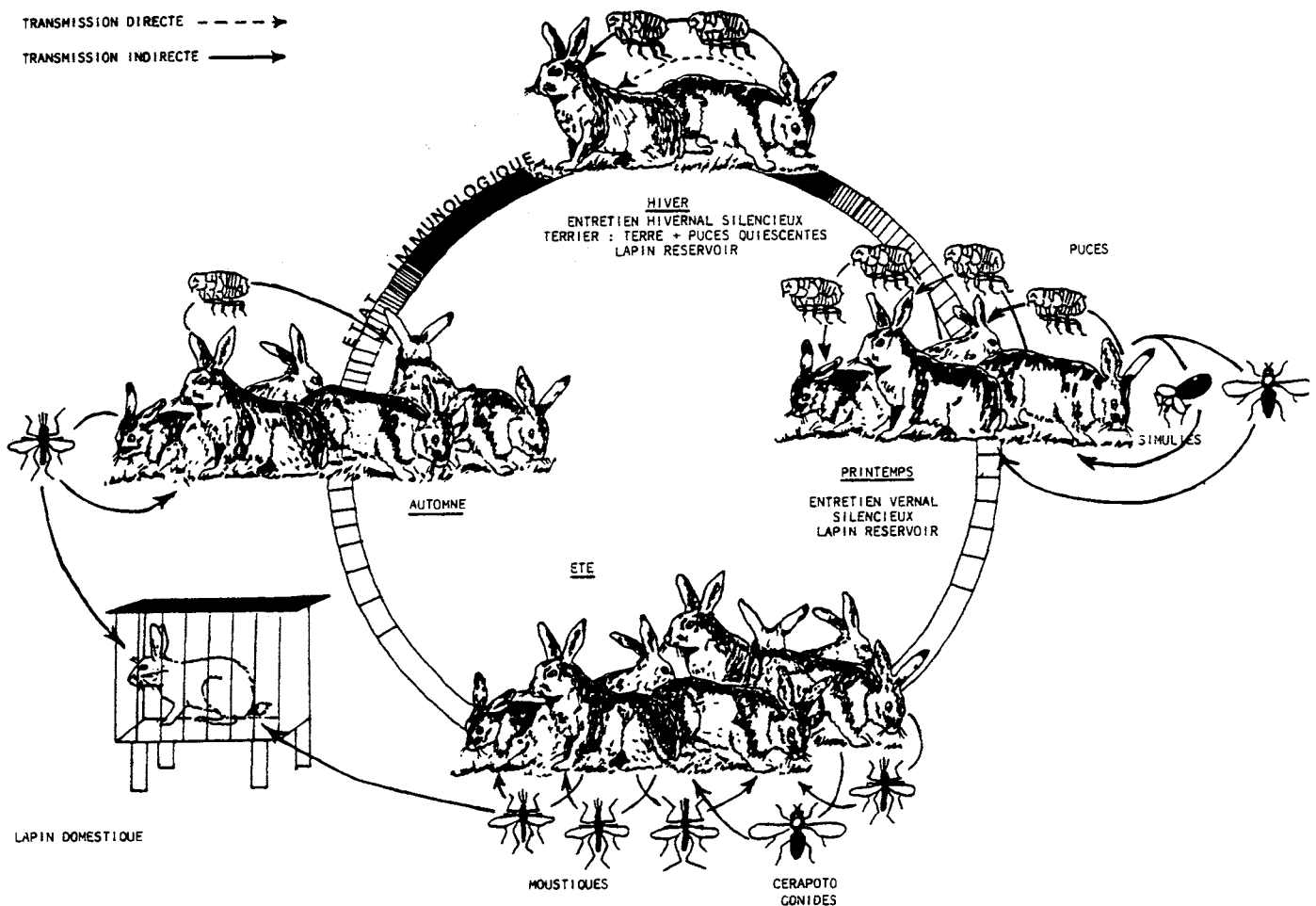


Fig 2 : cycle épidémiologique de la myxomatose en plein air (ARTHUR ET LOUZIS, 1988).

4- Pathogénie :

L' incubation dure en moyenne trois à quatre jours, mais elle peut varier de deux à dix-huit jours suivant les souches virales (JOUBERT et al, 1972). En effet, il existe différentes souches de virulence variable ; on les classe par grades (voir tableau1).

Souches (degré d' infectiosité)	I-II	III	IV	V	Californienne
Apparition et forme des myxomes primaires	3 ^{ième} jour ; très convexe, régulier, non délimité	3-4 ^{ième} jour ; convexe, +/- irrégulier, +/- délimité	3-4 ^{ième} jour ; +/- plat, irrégulier, délimité	5 ^{ième} jour ; plat, irrégulier, délimité	3 ^{ième} jour ; plat, régulier, non délimité
Généralisation(intensité)	++++	+++	++	+	++++
Taux de mortalité en %	100	90	65	23	100
Temps moyen de survie(en jour)	12	20	33	40	10
Infectiosité des lésions	+	+	+	+	++

Tableau 1 : Infectiosité expérimentale comparée de souches européennes et californienne de virus myxomateux *in vivo*(JOUBERT ET AL, 1972).

Il y a multiplication locale du virus au point d' inoculation pendant vingt-quatre heures puis apparition du myxome primaire au bout du deuxième ou du troisième jour.

Dès le deuxième jour, le virus envahit le nœud lymphatique satellite au point d' inoculation pour s' y multiplier à partir du troisième jour dans les cellules mononuclées (macrophages et lymphocytes). C' est aussi au deuxième jour que la virémie commence mais elle n' est notable qu' à partir du troisième ou du quatrième jour ; elle dure environ cinq jours (JOUBERT et al, 1972).

Il y a généralisation des signes cliniques à partir du cinquième jour. Le plus souvent, celle-ci s'accompagne d'une surinfection bactérienne. Après une expression du tableau clinique complet au bout de sept à huit jours, soit il y a mort de l'animal entre le dixième jour, pour les souches les plus virulentes, et le vingtième jour, soit guérison (JOUBERT et al, 1972).

L'animal guéri est naturellement protégé. On peut noter qu'il existe une protection croisée entre le virus de la myxomatose et celui du fibrome de Shope. Lors de réinfections, on peut observer une hypersensibilité retardée, qui provoque en général des lésions cutanées.

5- Réponse immunitaire antipoxvirale de l'hôte :

Dans ce chapitre, nous verrons quels sont les mécanismes qui permettent à un organisme de lutter contre une infection poxvirale.

Dans la réponse immunitaire, il existe trois phases différentes qui sont parfois interactives :

- une réponse innée qui est immédiate et non inductible.
- une réponse inductible précoce qui est non spécifique de l'antigène.
- une réponse inductible tardive qui est spécifique de l'antigène, qui entraîne la mémoire immunologique et qui dépend des lymphocytes T.

Ces trois phases reposent sur l'intervention de différentes cellules :

- La résistance innée et la réponse inductible précoce reposent sur les macrophages et les cellules Natural killer. Ces cellules sont induites par les interférons et sont responsables d'une action anti virale précoce.
- La réponse tardive spécifique est cruciale pour le contrôle et la guérison des infections virales. Elle fait intervenir des lymphocytes B, T auxiliaires et T cytotoxiques. Ces cellules sont d'abord activées puis subissent une expansion clonale pour enfin se différencier en lymphocytes T CD4+ qui produisent et sécrètent différentes cytokines, en lymphocytes T CD8+ qui provoquent la lyse des cellules infectées et en lymphocytes B qui produisent et sécrètent des anticorps spécifiques des antigènes. Ces

- anticorps ont une action indépendante par rapport aux cellules productrices.

a- Réponse immunitaire non spécifique :

les cellules de l' inflammation

Lors d' une primo-infection, les premières cellules qui pénètrent dans la lésion primaire sont les leucocytes polynucléaires puis vingt quatre heures après, c' est au tour des monocytes/macrophages. Après le développement de la réponse immunitaire, des lymphocytes T CD4+ spécifiques migrent vers la lésion et sécrètent alors des substances chimotactrices et activatrices stimulant l' arrivée de nouvelles cellules inflammatoires (FENNER et al, 1948).

Il semble que pour les poxvirus, la phagocytose des particules virales par les neutrophiles et les macrophages n' aboutirait pas à leur élimination mais semble plutôt favoriser leur dissémination(FENNER et al, 1948).

Les interférons :

Ce sont des molécules capables de rendre les cellules résistantes aux infections virales (SEN ET LENGYEL, 1992) et qui sont considérées comme des cytokines pléiotropes.

Ils n' ont pas seulement un rôle de protection contre les agents pathogènes, contre les tumeurs et les antigènes mais ils ont aussi un rôle de régulateur des réponses immunitaires et inflammatoires.

Les poxvirus induisent la production d' interférons non seulement chez les animaux mais aussi en culture cellulaire ; mais cette production varie en fonction de la souche et du genre poxviral (BUTTNER et al, 1995). On pense que pour le virus de la vaccine, l' induction est liée à la présence d' ARN double brin dans les cellules infectées (COLBY ET DUESDERG, 1969).

Les interférons vont induire la synthèse de protéines effectrices à activité anti-poxvirale, en particulier la protéine kinase dépendante des ARN double brin(PKR) et la 2-5 synthétase, qui sont synthétisées sous forme inactive et dont l' activation se fait par fixation d' ARN double brin (FARRAR et al, 1993). De même, ils induisent la synthèse de l' oxyde nitrique synthétase qui permet la production de NO à activité antivirale et qui est un activateur des macrophages et de leur

cytotoxicité (KARUPIATH et al, 1993). Ces interférons favorisent donc la réponse immunitaire à médiation cellulaire mais ils stimulent aussi l'expression de $\text{TNF } \alpha$ et de l'interleukine 1β , ce qui a pour conséquence d'augmenter la destruction intracellulaire des virus.

Ils induisent l'expression des glycoprotéines des CMH I et des CMH II permettant alors une meilleure présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T et donc une meilleure réponse (MULLER et al, 1994).

Ainsi les interférons sont importants pour une protection efficace contre les poxvirus.

L'activation du complément

Elle correspond à une cascade d'événements qui aboutit soit à la destruction de l'agent, soit à son inactivation, par fixation de protéines à la surface de l'agent infectieux inhibant alors son entrée dans la cellule cible ou favorisant son opsonisation et sa phagocytose.

Par formation du complexe d'attaque des membranes, l'activation du complément permet aussi la lyse de l'agent infectieux ou de la cellule infectée.

De même, l'activation du complément engendre une libération de peptides qui renforce la réponse inflammatoire au site de l'infection.

L'activation du complément favorise la neutralisation virale *in vitro* et joue un rôle dans l'élimination des virions *in vivo* (BULLER ET PALUMBO, 1991).

Cette activation est donc non essentielle à l'induction de la réponse inflammatoire initiale mais influence son amplitude lors d'infection poxvirale (MILLER et al, 1995).

Les cellules Natural Killer

Elles sont responsables d'une activité cytolytique non spécifique. Ce sont de grands lymphocytes granuleux qui provoquent la lyse des cellules infectées sans intervention d'anticorps spécifiques et qui produisent aussi des interférons gamma.

Les cellules Natural killer ont une activité cytolytique élevée contre les poxvirus et entraînent une protection précoce mais c'est la production d'interféron gamma qui est le point primordial de leur action (KARUPIAH et al, 1990 ; RAMSHAW et al, 1992).

b- La réponse immunitaire spécifique anti poxvirale :

la réponse à médiation humorale :

Elle est fondée sur la production d' anticorps spécifiques dirigés contre des polypeptides viraux (FENNER, 1992). Ces anticorps peuvent être des IgM à durée de vie courte ou des IgG persistantes.

Il existe deux types d' anticorps :

- Les anticorps neutralisant l' infectivité virale qui sont dirigés contre les virions enveloppés et les non enveloppés.
- Les anticorps qui, liés aux antigènes, participent à l' activation du complément et provoquent la lyse des cellules infectées.

Les anticorps spécifiques antipoxviraux, comme souvent lors de réponse à médiation humorale, ne sont pas déterminants pour lutter contre une primo infection mais jouent un rôle non négligeable dans la prévention d' une réinfection (MC FADDEN et al, 1994).

La réponse à médiation cellulaire :

C' est un mécanisme de défense tardif qui fait intervenir les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Les lymphocytes T reconnaissent spécifiquement les antigènes étrangers présentés par les cellules infectées dans le contexte du CMH.

Les mécanismes antiviraux sont complexes. Ils se fondent sur les effets des lymphokines produites par les lymphocytes T CD4+ et sur les effets directs des lymphocytes T CD8+ qui provoquent la lyse des cellules infectées et donc l' élimination des particules virales en formation.

c- Conclusion :

Les phénomènes cytotoxiques ont une grande importance dans la protection contre les infections poxvirales même si tous les acteurs de l' immunité, qu' ils soient spécifiques ou non, interviennent.

Malgré l' existence de ces nombreux mécanismes de défense, l' individu infecté n' arrive pas toujours à lutter de façon efficace contre une infection poxvirale du fait

de l'existence de mécanismes d'échappement au système immunitaire chez les poxvirus.

II- Les poxvirus et le modèle virus de la vaccine:

1- Les poxvirus : Morphologie et structure:

a- Généralités :

Les *Poxviridae* sont une famille de gros virus, dont le génome est une molécule d'ADN bicaténaire de 140 à 380 kilobases selon les genres. Ils ont la capacité de coder pour environ 200 protéines, parmi lesquelles des facteurs de virulence leur permettant de s'adapter aux conditions dysgénésiques créées par les hôtes qu'ils infectent.

Les *Poxviridae* constituent une grande famille comprenant 11 genres. (Voir tableau 2). Cette famille se divise en deux sous-familles qui sont d'une part, la sous-famille des *Chordopoxvirinae* infectant les vertébrés, dont le virus myxomateux fait parti, et d'autre part, la sous-famille des *Entomopoxvirinae* infectant les invertébrés. Les différents genres compris dans ces deux sous-familles sont constitués sur la base de la morphologie virale, du tropisme viral (spectre d'hôte), de l'aptitude à réactiver un autre virus et de la composition antigénique de la capside ou de l'enveloppe (JOUBERT et al, 1972. ; HU FANG QI et al, 1994).

Le virus myxomateux appartient au genre *Leporipoxvirus* (FRANCKI et al, 1991). L'étude du virus de la vaccine ayant précédé celle de tout autre poxvirus, le virus de la vaccine est devenu le modèle de choix au sein de cette famille. Ainsi notre étude, prendra souvent le virus de la vaccine comme modèle. Malgré les grandes similitudes entre les deux virus, tant au niveau morphologique que moléculaire, nous discuterons des éléments de différenciation.

Genre	Espèce type	Principales maladies humaines et animales
<i>Orthopoxvirus</i>	virus de la vaccine	vaccine variole humaine variole bovine variole du cheval variole du lapin ectromélie variole simienne
<i>Parapoxvirus</i>	virus de l'ecthyma contagieux	ecthyma contagieux stomatite papuleuse nodule des trayeurs
<i>Avipoxvirus</i>	virus de la variole aviaire	variole aviaire variole du dindon variole du pigeon variole du canari
<i>Capripoxvirus</i>	virus de la clavelée	clavelée ou variole ovine variole caprine dermatose nodulaire des bovins
<i>Leporipoxvirus</i>	virus de la myxomatose	myxomatose fibromatose (fibrome de Shope) fibrome du lièvre fibrome de l'écureuil
<i>Suipoxvirus</i>	virus de la variole porcine	variole porcine
<i>Molluscipoxvirus</i>	virus du molluscum contagiosum	molluscum contagiosum de l'homme
<i>Yatapoxvirus</i>	virus de la tumeur Yaba du singe	tumeur Yaba du singe Tana de l'homme

Tableau 2 : Poxvirus des vertébrés (BULLER ET AL, 1991).

b- Morphologie et structure des Poxvirus :

Les *Poxviridae* sont parmi les plus gros et les plus complexes des virus animaux connus. Ils se répliquent dans le cytoplasme des cellules infectées et codent pour de nombreuses enzymes et facteurs de virulences. Les virions ont une structure ovale ou en forme de brique d' une longueur de 200 à 400 nm. Le virion myxomateux a une longueur de 286 nm(+/- 15 nm), une largeur de 230 nm(+/- 20 nm) et une épaisseur de 75 nm(+/- 10 nm). Sa densité est de 1.3 g/cm³ en gradient de chlorure de césium (JOUBERT et al, 1972).

Sur coupe fine en microscopie électronique, on distingue un core entouré d' une bicouche lipoprotéique (Voir Fig 3). Sur certaines vues, le core apparaît biconcave, avec deux structures appelées corps latéraux, nichées dans les concavités. (MOSS, 1992). (Voir Fig 4).

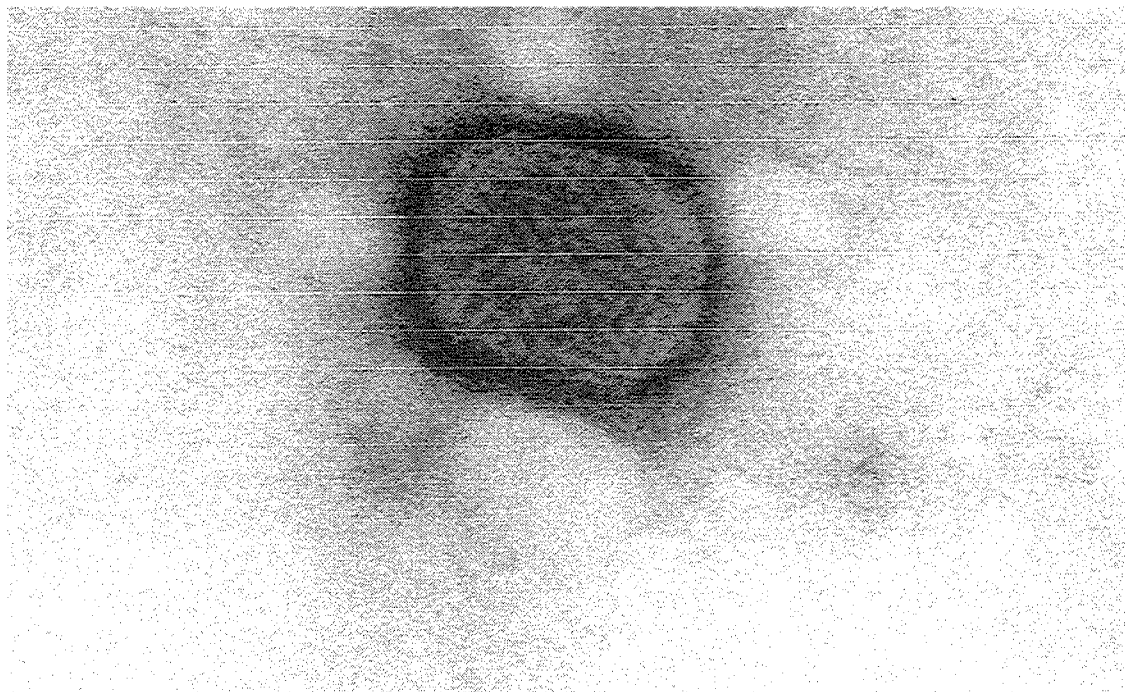


Fig 3 : Vue en microscopie électronique du virus de la vaccine.

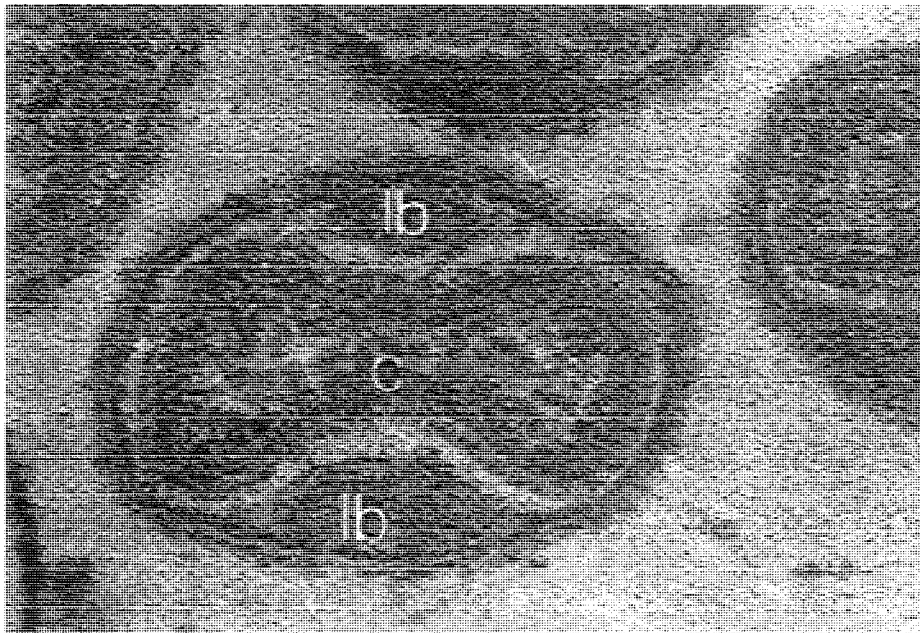


Fig 4 : Section fine (microscopie électronique) du virus de la vaccine.

Le virus produit deux formes infectieuses distinctes : les virus intracellulaires matures ou IMV, et les virus extracellulaires enveloppés ou EEV (SMITH, 1993). Les EEV sont structurellement reconnaissables des IMV par le fait qu' ils possèdent une enveloppe supplémentaire dérivée de l' appareil de Golgi (SCHMELZ et al, 1994). (Voir Fig 5).

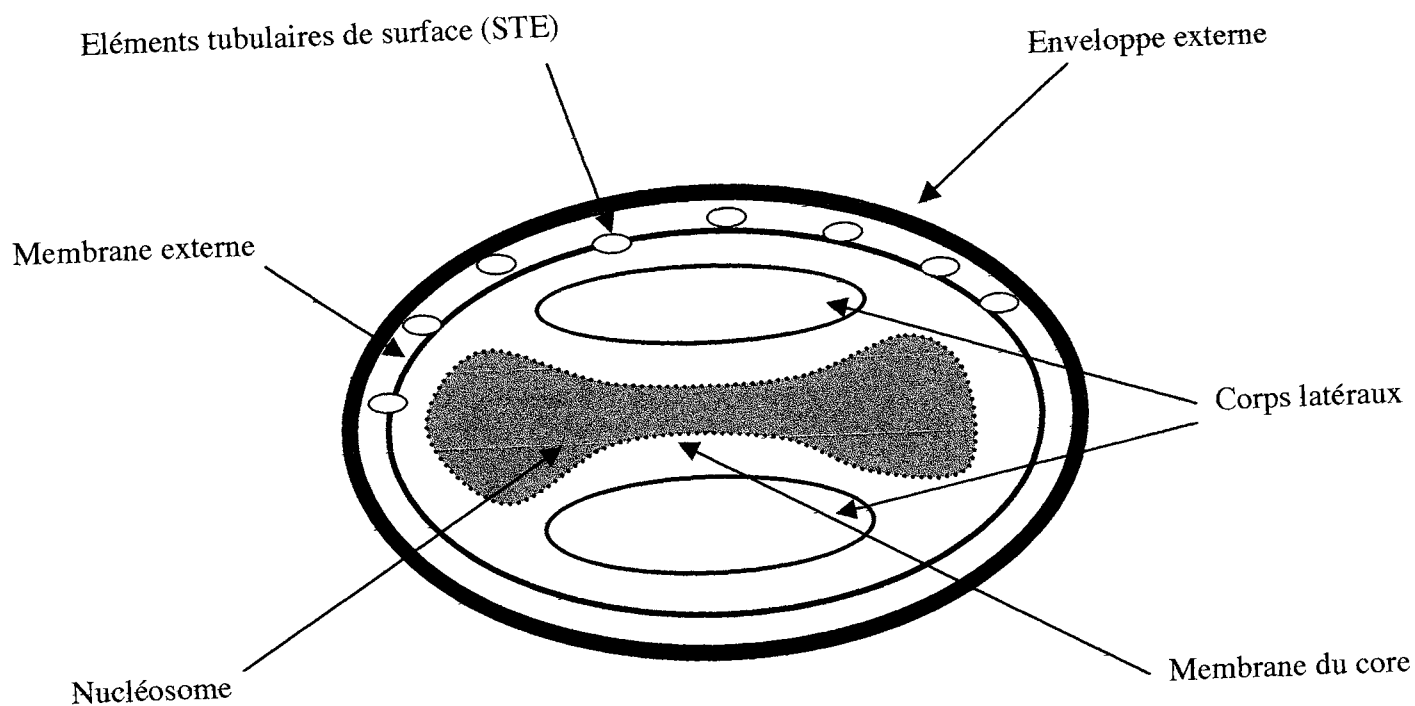


Fig 5 : Vue schématique d' un *Orthopoxvirus* (forme EEV).

Le nucléoïde central ou core, est un disque biconcave en forme d' haltère. Il est constitué d ' une molécule d ' ADN bicaténaire de 80 μ m de long, associée à des protéines dans un arrangement hélicoïdal, intriquée avec les sous unités de la

zone à palissade (MAURIN, 1985). Il n' existe pas de protéine de type histone et on trouve incorporées dans le core plusieurs enzymes dont certaines sont impliquées dans la transcription ou la modification des ARN(MOSS, 1992).

La capside est décalée de 20 Å de l' ADN, a une épaisseur de 14 nm et elle est constituée de deux zones. La zone externe ou zone à palissade qui est formée par un ensemble de tubules creux de 4.5 nm de large, de 9 nm de long, espacés de 4 nm. La zone interne ou zone pointillée est lisse ; elle est formée par le prolongement des tubules et son épaisseur est de 4 nm (MAURIN, 1985).

Les corps latéraux sont mal connus et ont une épaisseur variant de 0.6 à 80 nm. Ils sont de nature protéique (ils contiennent en particulier des Antigènes internes communs aux poxvirus) (MAURIN, 1985). Des études tendent à montrer que ces corps latéraux seraient des artefacts de coloration en microscopie électronique conventionnelle (DUBOCHET, 1994). Néanmoins, une analyse structurale récente contredirait cette idée (GRIFFITH et al, 2001).

La membrane externe encore appelée le revêtement bosselé a une épaisseur de 20 à 25 nm. En microscopie électronique conventionnelle (coloration négative), elle prend l' apparence d' un réseau complexe de tubules ordonnés ou de filaments creux non ordonnés. Ces tubules ou ces filaments ont une largeur de 9 nm dont la lumière est de 3 nm (JOUBERT et al, 1972). Ils pourraient être constitués d' un ruban protéique bicaténaire formé de deux brins de 3 nm de large enroulé hélicoïdalement par rapport au grand axe formant une double hélice de 12 nm de pas pour une largeur de 9 nm (MAURIN, 1985). Ces tubules sont associés à une membrane lipidique. Il faut noter qu' en cryomicroscopie, la surface des IMV apparaît lisse et semble constituée d' une double membrane (DUBOCHET et al , 1994).

Il existe pour les formes EEV, *une enveloppe supplémentaire* par rapport aux formes IMV. Pour sa formation, le virus emprunte la membrane de l' appareil de Golgi des cellules. Cette membrane est associée à des Antigènes originaux et a une épaisseur de 150 Å (SIMMS et al, 1998). La production d' EEV passe par la formation d' un intermédiaire, les IEV (virus enveloppé intracellulaire), qui lors de la

fusion de leur enveloppe la plus externe avec la membrane cellulaire libèrent les EEV hors de la cellule.

L'ADN du virus myxomateux est construit comme celui de tous les poxvirus. C'est un ADN bicaténaire unique qui représente 3 % de la masse du virion. Il est constitué de 160 à 163 kpb. Les deux brins sont reliés entre eux à leurs extrémités par des liaisons covalentes, d'où un aspect en épingle à cheveux (MURPHY, 1996). Le génome est linéaire et on peut distinguer différentes zones. La zone centrale est fortement conservée dans le genre, elle correspond aux gènes essentiels pour le cycle viral. Les régions périphériques contiennent quant à elles les gènes impliqués dans l'expression du pouvoir pathogène. Les régions terminales sont constituées de RIT, Répétitions Inversées Terminales, qui contiennent neuf gènes. Dans ce génome, il y a peu de séquences non codantes, pas d'introns, des séquences promotrices courtes, de nombreux ORF de faible taille, ce qui explique l'existence d'environ 200 gènes pour 160 kpb (JONHSON et al, 1993). (Voir Fig 6). Les poxvirus constituent d'excellents vecteurs viraux du fait de l'existence de gènes non essentiels pour leur cycle, et de leur capacité à insérer des fragments d'ADN étrangers par recombinaison homologue, ceux-ci pouvant atteindre 25 kpb au total (SMITH ET MOSS, 1993).

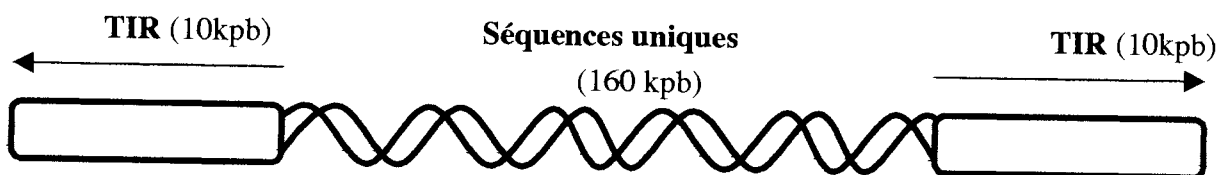


Fig 6: Génome du virus de la vaccine (schéma). TIR : régions terminales répétées inversées.

2- Cycle viral des Poxvirus :

Le cycle de réplication du virus myxomateux semble identique, dans ses différentes étapes, à celui de tous les autres poxvirus. On se fondera donc, dans la suite de cet exposé sur celui de la vaccine. Il a lieu entièrement dans le cytoplasme de la cellule et sa durée est comprise entre douze et trente six heures. Cette durée varie en fonction de la souche virale et du type de cellule infectée. Dans ce cycle, on peut distinguer une phase extra-cellulaire et trois phases intra-cellulaires. (Voir fig 7).

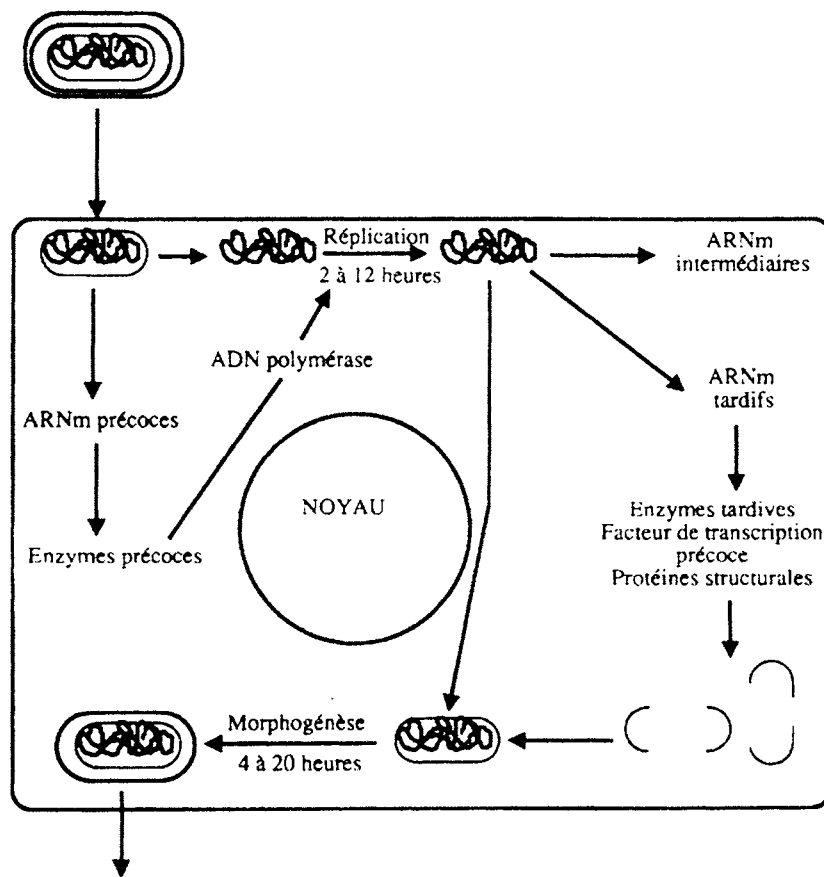


Fig 7 : Cycle de réplication du virus de la vaccine (MOSS, 1991).

Adsorption et pénétration du virus dans la cellule hôte :

Cette phase dure de trente minutes à quatre heures et peut être divisée en deux parties :

- une phase d' adsorption qui est due à un phénomène électrostatique et qui est réversible pendant deux heures à 37 °c.

- une phase d' attachement qui est irréversible (FIELDS, 1993).

Pour le virus de la vaccine, on sait qu' il existe au moins deux types de récepteurs correspondants aux deux formes virales : système chondroïtine sulfate pour les IMV et héparate sulfate pour les EEV (HSIAO, CHUNG ET CHANG, 1999), (HSIAO, CHUNG ET CHANG, 1998).

L' existence de récepteurs cellulaires spécifiques a été proposée pour le virus myxomateux, ils appartiendraient à la famille des récepteurs aux chémokines (MC FADDEN et al, 1999). Néanmoins, des travaux plus récents ne confirmeraient pas le rôle de ces récepteurs aux chémokines.(MASTERS et al, 2001). De fait, aucun récepteur spécifique aux poxvirus (y compris le virus myxomateux) n' a encore été clairement identifié.

Phase intra-cellulaire précoce :

Le mécanisme de virocytose, c' est à dire le phénomène par lequel le virus rentre dans la cellule, est peu connu. On pense que pour le virus de la vaccine, elle aboutit, au moins pour une des formes, à la formation d' une vacuole renfermant le virus mais on ne sait pas si cela se fait par endocytose à récepteur spécifique ou par phagocytose. De plus, il semblerait que les IMV puissent pénétrer dans la cellule par fusion directe avec la membrane plasmique (VANDERPLASSCHEN et al, 1998). Une fois le virus entré dans la cellule, il subit une décapsidation en deux étapes. La première consiste en la perte des phospholipides et de la moitié des protéines du virus, bien que le génome soit toujours séquestré dans le core, ce qui le rend résistant aux Dnases exogènes cellulaires. La deuxième étape voit le génome devenir accessible aux Dnases. Ainsi cette décapsidation permet non seulement le déshabillage de l' ADN et sa libération dans le cytoplasme cellulaire mais aussi la synthèse d' ARNm dits précoces moins d' une heure après la pénétration totale du virus dans la cellule (FIELDS, 1993). En effet, les membres de la famille des *Poxviridae* synthétisent leurs ARNm dans le cytoplasme de la cellule infectée. Cette capacité dépend de leurs propres enzymes et facteurs de

transcription et de l'incorporation dans la particule virale infectieuse de protéines nécessaires à la synthèse d'ARNm précoces. Les enzymes présentes dans le core du virus comprennent un système complet permettant la transcription des gènes précoces, la polyadénylation et le « coiffage » des ARNm ainsi formés. Ainsi le virus est « préparé » à exprimer certains de ses gènes immédiatement après la pénétration dans le cytoplasme. D'autres gènes seront ensuite exprimés après la réplication de l'ADN viral (MOSS, 1992).

Phase intra-cellulaire d'éclipse :

On parle de phase d'éclipse car le virion n'existe plus en tant qu'entité. Il y a tout d'abord réplication de l'ADN viral. Cette réplication dure de deux à douze heures et est permise grâce à l'ADN polymérase et aux enzymes précoces traduites à partir des ARNm précoces (FIELDS, 1993). Il y a ensuite synthèse d'ARNm intermédiaires et tardifs qui permettent la synthèse des différents constituants des futurs virions (PETIT et al, 1997).

Dernière phase intra-cellulaire :

Dans cette dernière phase, il y a assemblage des différents constituants des virions et sortie des virions de type EEV par fusion à la membrane de la cellule. La phase de morphogénèse a une durée qui varie de quatre à vingt heures. Cette phase aboutit à terme à la lyse des cellules, quelques jours après la libération des premiers virions, par perturbation des synthèses protéiques (PETIT et al, 1997). Cette lyse permet la libération des IMV.

C'est un cycle très productif. On sait par exemple que pour le virus de la vaccine, une particule virale donne deux à trois mille virions au cours d'un seul cycle, ce qui permet une dissémination importante du virus.

Effets du cycle viral sur le métabolisme de la cellule infectée :

Durant le cycle de réplication, les poxvirus inhibent le métabolisme propre à la cellule par plusieurs procédés :

- diminution de la synthèse d'ADN cellulaire par l'intervention d'une endonucléase virale qui hydrolyse cet ADN (BULLER ET PALUMBO, 1991).

- diminution des synthèses d'ARN cellulaires par une diminution de l'activité de l'ARN polymérase II cellulaire (PEDLEY ET COOPER, 1984) et de la stabilité des ARNm (ODA.ET JOKLIK, 1967).
- diminution des synthèses protéiques, par inhibition de la traduction des ARNm de l'hôte (CACOULOS ET BABLANIAN, 1991).

On peut alors penser que cette diminution du métabolisme cellulaire permet un apport accru de constituants cellulaires utilisés pour la synthèse des virions au cours du cycle de réplication.

Nous venons de voir dans cette partie que l'étude du cycle viral est complexe. Cette étude est compliquée par la coexistence de deux formes virales infectieuses (IMV et EEV), que nous allons étudier à présent.

3- Les deux formes infectieuses IMV et EEV :

a- Généralités :

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, il existe deux virions infectieux antigéniquement et structurellement différents, pour les Poxvirus : les virus intracellulaires matures (IMV) et les virus extracellulaires enveloppés (EEV). Pour le virus de la vaccine, on estime les proportions IMV/EEV à environ 99% d'IMV contre 1% d'EEV (SMITH ET VANDERPLASSCHEN, 1998). Mais en fait, cette proportion est fonction de la souche virale et des cellules employées. Une étude non publiée, réalisée au laboratoire de microbiologie moléculaire de l'école nationale vétérinaire de Toulouse se fondant sur la mise en évidence d'EEV et d'IMV en microscopie électronique, a montré qu'en ce qui concerne le virus myxomateux, la proportion passait à 70% à 80% d'IMV pour environ 20% à 30% d'EEV avec le souche myxomateux T1 sur cellules RK13 (communication personnelle J.GELFI ET S.BERTAGNOLI).

Ainsi le virus de la vaccine (et les autres *Chordopoxvirinae* tel que le virus myxomateux) est-il original dans le fait qu' il produit deux types de virions infectieux, avec des propriétés structurales, antigéniques et biologiques différentes. Ceci confère probablement un avantage au virus lors de la transmission par différentes voies mais peut être aussi dans la définition du spectre tissulaire et d' espèce.

b- Caractéristiques des deux formes infectieuses :

♦ Propriétés morphologiques :

Les EEV sont structurellement reconnaissables des IMV par le fait qu' ils possèdent une enveloppe supplémentaire dérivée de l' appareil de Golgi (SCHMELZ et al, 1994). De plus, ils possèdent au moins dix polypeptides absents des IMV et semblent être la forme virale permettant la dissémination du virus sur une longue distance (PAYNE, 1980).

Quant au nombre exacte d' enveloppe sur chacune des formes virales, il existe de nombreuses controverses. Les premières études décrivaient une seule enveloppe aux IMV (DALES ET MOSBACH, 1968). Mais plus récemment, il a été reporté que la forme IMV était constituée d' un core surmonté de deux enveloppes dérivant du compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l' appareil de Golgi, ce qui s' oppose au fait qu' une seule enveloppe est visible après un traitement normal (SODEIK et al, 1993). Néanmoins, les dernières publications confirmeraient les premières études, soit que que les IMV possèdent une seule enveloppe et donc les formes EEV, deux. Enfin, deux dernières publications de novembre 2001 reprennent l' hypothèse des deux enveloppes pour les IMV (GRIFFITH et al, 2001, a et b). Quoiqu' il en soit, retenons que les EEV possèdent une enveloppe supplémentaire par rapport aux IMV.

♦ Propriétés physico-chimiques :

Les formes virales IMV et EEV ont des propriétés physico-chimiques différentes. Ceci s' explique, en partie par la présence d' une membrane supplémentaire autour du virion EEV.

En effet, la membrane externe des EEV est extrêmement fragile (ROOS et al, 1996) et est endommagée par la purification du virus (ICHIHASHI 1996, VANDERPLASSCHEN et al, 1997). De plus, cette membrane est détruite à pH acide (VANDERPLASSCHEN et al, 1998), ce qui pourrait jouer un rôle dans la pénétration des formes EEV dans la cellule comme nous le détaillerons plus loin dans cet exposé.

♦ Propriétés biologiques :

◇ Mode de pénétration du virus dans la cellule :

Pour une meilleure compréhension du sujet, nous allons tout d'abord envisager la pénétration dans la cellule hôte des virus enveloppés en général puis nous nous attacherons plus particulièrement aux poxvirus.

Pénétration des virus enveloppés :

L'interaction initiale entre un virus et sa cellule cible contrôle le tropisme du virus, et constitue une cible privilégiée de la réponse immunitaire. Pour pénétrer dans une cellule, les virus enveloppés doivent franchir deux étapes, la liaison à la cellule et la fusion de leur enveloppe avec la membrane cellulaire.

L'attachement ou liaison du virus à la cellule cible est rapide (quelques minutes), et n'implique pas d'activité métabolique cellulaire majeure, car il est observé à 4°C. La liaison directe du ligand viral sur le récepteur cellulaire permet l'attachement, comme le montrent les liaisons des formes solubles des ectodomaines (domaines situés sur la surface externe d'une membrane) du ligand viral et du récepteur cellulaire (DEVAUX et al, 1997). Au cours de l'étape de liaison, des changements de conformation, touchant le récepteur et le ligand viral, doivent intervenir pour permettre l'étape de fusion.

La fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique est, a priori, un processus coûteux en énergie. Elle fait généralement intervenir une unité de fusion, ancrée dans l'enveloppe et capable de projeter un peptide hydrophobe, qui ira s'ancrer dans la membrane opposée. Cela implique donc un changement conformationnel majeur, car le peptide de fusion doit être initialement enfoui loin du solvant aqueux. Ce changement de conformation est induit de deux manières, par

un pH acide ou par une perturbation « mécanique » d' un état métastable, lors de l' étape de liaison du ligand viral au récepteur cellulaire. Dans le cas de l' activation à pH acide, c' est l' endocytose des virus, induite par le récepteur, qui va conduire la particule virale dans un compartiment à pH 5 environ. Dans le cas d' une fusion à pH neutre, la liaison ligand viral-récepteur, soit induit l' interaction secondaire du ligand avec un co-récepteur qui sera responsable de l' activation de l' unité de fusion, soit active directement l' unité de fusion (GERLIER, 1998). L' étape suivante doit permettre la fusion des deux couches externes de phospholipides des membranes cellulaire et virales, ou hémifusion. Une fois le pore ouvert, la nucléocapside peut pénétrer dans la cellule, et le cycle réplcatif du virus commence. Au cours du processus de fusion, il n' y a donc pas d' inversion de l' asymétrie membranaire et les ectodomaines des ligands viraux et des unités de fusion restent orientés vers l' extérieur de la cellule (GERLIER et al, 1997 ; KLOTZ et al, 1996), ce qui explique notamment la formation de syncytiums.

Ainsi les protéines, exposées à la surface des virus animaux, sont les acteurs de l' entrée du virus dans la cellule cible. Elles servent de ligands pour l' accrochage aux cellules cibles, via un récepteur cellulaire. Selon la nature du récepteur utilisé, elles dictent le choix de l' espèce hôte et le tropisme tissulaire du virus, et donc, la physiopathologie de l' infection virale. De plus, elles sont la cible de la réponse humorale neutralisante, et donc des acteurs de l' inactivation des virus par les mécanismes de défense de l' hôte.

Pénétration du virus myxomateux :

Le pré-requis évident pour qu' un virus pénètre dans une cellule est son attachement à cette cellule. L' étude de l' attachement des virus de la vaccine et de la myxomatose est compliquée ,comme nous l' avons vu précédemment , par l' existence de deux types de particules infectieuses. Il a été démontré que les particules IMV et EEV, s' attachent à des récepteurs cellulaires différents. Cette conclusion repose sur trois observations indépendantes :

- L' efficacité de l' attachement des particules IMV et EEV varie de manière indépendante entre différentes lignées cellulaires. (VANDERPLASSCHEN ET SMITH, 1997)

- Le traitement de la surface cellulaire à l' aide de certaines enzymes, affecte différemment l' attachement des particules IMV et EEV.(VANDERPLASSCHEN ET SMITH, 1997)
- L' attachement d' un anticorps monoclonal à la surface cellulaire interfère avec l' attachement des particules IMV, mais pas EEV.(VANDERPLASSCHEN ET SMITH, 1997)

En ce qui concerne la pénétration du virus proprement dite, là encore deux mécanismes interviennent, qu' il s' agisse de la forme IMV ou EEV. La pénétration des EEV, à l' inverse des IMV, semble dépendante d' une réduction de pH et, la particule IMV contenue dans la particule EEV exhibe une activité fusogénique exacerbée par un pH acide (VANDERPLASCHEN, HOLLINSHEAD ET SMITH, 1998). Comme nous l' avons déjà vu, la membrane externe des particules EEV est très fragile et un PH acide induit sa rupture. En général, les virus qui entrent dans la cellule d' une façon dépendante d' un pH bas, fusionnent seulement après internalisation et exposition à un environnement acide. Une fois sa membrane externe endommagée, la particule EEV conserve son infectiosité comme la forme IMV. En conséquence, le mécanisme de pénétration de la forme EEV intacte semble différent de celui d' une forme endommagée qui a les mêmes protéines exposées à la surface que la forme IMV. Ainsi ICHIHASHI en 1996 propose t' il un modèle pour la pénétration des particules EEV dans la cellule. Ce modèle consiste en l' attachement de la particule EEV à la surface cellulaire, endocytose de l' EEV, destruction de son enveloppe externe sous l' effet de la réduction de pH dans l' endosome, et enfin fusion de la particule IMV à présent exposée avec la membrane de l' endosome et libération du core dans le cytoplasme. Ainsi, selon l' état de l' enveloppe externe, soit la forme EEV est endocytée à l' intérieur d' une vésicule intracellulaire, comme nous venons de le voir, soit elle fusionne directement avec la membrane cellulaire au même titre qu' un IMV dans le cytoplasme. (Voir Fig 8). L' enveloppe externe des particules EEV paraît donc avoir au moins deux rôles :

- assurer l' attachement de la particule à la surface cellulaire
- et protéger la particule IMV interne.

En ce qui concerne les particules IMV, après attachement à la cellule, l' enveloppe virale (la membrane externe) fusionnerait avec la membrane cytoplasmique, en libérant soit une particule virale nue si on considère le virion initial avec une seule enveloppe (VANDERPLASSCHEN et al, 1998), soit une particule virale avec une seule membrane dans le cytoplasme si on considère le virion initial avec deux enveloppes. Mais, dans ce cas, on ne sait toujours pas expliquer comment la seconde enveloppe est perdue. Dernièrement, un nouveau mécanisme unifié de pénétration des IMV et EEV a été proposé (PEDERSEN et al, 2000 ; KRIJNSE-LOCKER et al, 2000) : les deux formes virales ne pénétreraient pas par fusion cellulaire, mais subiraient un dépliement des enveloppes à la surface de la membrane plasmique, libérant ainsi le core en position extracellulaire. Cette hypothèse très originale n' explique pas comment le core est ensuite transporté à travers la membrane cellulaire jusqu' au cytoplasme, mais elle a le mérite d' être valable quel que soit le nombre d' enveloppes attribuées aux deux formes virales.

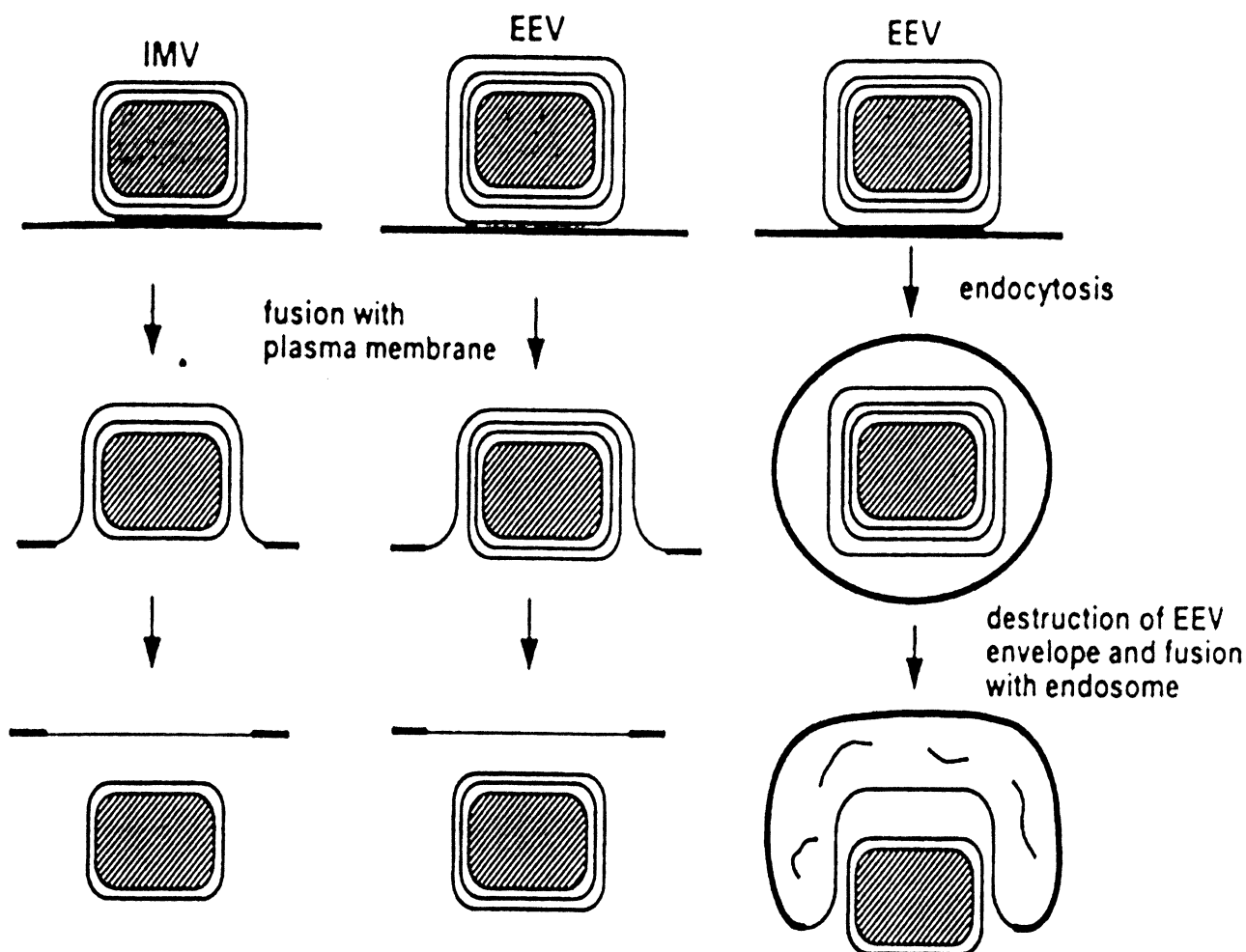


Fig 8 :Modèle d'entrée du virus de la vaccine (VANDERPLASSCHEN et al, 1998).

Dans ce modèle, les IMV possèdent deux membranes et les EEV, trois. Après l'attachement des IMV à la cellule, la membrane externe des IMV fusionne avec la membrane cytoplasmique, relarguant dans le cytoplasme, une particule virale avec une membrane. On ne sait pas comment est perdue la deuxième membrane.

Soit les EEV fusionnent avec la membrane cellulaire relachant un IMV dans le cytoplasme (schéma du centre), soit il y a une endocytose à l'intérieur d'un endosome (schéma de droite). La membrane de l'EEV serait ensuite détruite (ICHIHASHI, 1996), produisant un IMV qui fusionne avec l'endosome relachant dans le cytoplasme le core entouré d'une membrane.

◇ Résistance du virus à la neutralisation par les anticorps et à la lyse par le complément:

Là encore les deux formes virales ont une résistance différente vis à vis des anticorps neutralisants. Les particules EEV, à l' inverse des particules IMV, sont résistantes à la neutralisation par les anticorps. Certains anticorps reconnaissent une protéine de surface cellulaire sensible à la trypsine et inhibent stériquement l' attachement des IMV à la cellule, cependant l' inhibition est incomplète (VANDERPLASSCHEN et al, 1998).

Ainsi la forme EEV est-elle résistante à la neutralisation par les anticorps. La forme IMV est inhibée correctement par différents sérums, alors qu' aucun sérum n' est capable d' inhiber l' infectiosité de la forme EEV .(VANDERPLASSCHEN, HOLLINSHEAD ET SMITH 1998). En fait, il s' agit ici de sérums dirigés contre les particules virales. En effet, LAW et SMITH montrent que ce n' est pas vrai avec des anticorps monospécifiques. Ceux-ci provoquent l' agrégation des EEV et empêchent leur attachement à la cellule. Cette inhibition semble complexe et semble faire intervenir plusieurs protéines car des mutants déficients en protéines d' enveloppe n' échappent pas complètement à la neutralisation. Quoiqu' il en soit, les auteurs soulignent que les EEV sont plus résistants à la neutralisation que les IMV (LAW et SMITH, 2001).

En ce qui concerne la sensibilité à la lyse par le complément, les EEV qui sont produits sur une lignée cellulaire de la même espèce que celle du complément testé, sont, à l' inverse des IMV, résistantes à cette lyse. Cette résistance des EEV ne serait pas due aux protéines virales d' enveloppe codées par les gènes B5R, A34R, A36R, A56R. Les EEV se sont par contre révélées sensibles lorsqu' elles étaient testées avec du complément appartenant à une autre espèce que celle des cellules utilisées pour produire le virus. Ainsi, la résistance des EEV au complément serait conférée par l' incorporation de protéines cellulaires dans l' enveloppe externe des particules EEV (VANDERPLASSCHEN, MATHEW, HOLLINSHEAD, SIM ET SMITH, 1998).

c- Formation des deux formes infectieuses :

♦ Schéma général :

Le cycle de multiplication du virus de la vaccine se réalise entièrement dans le cytoplasme. Les premières structures identifiables par microscopie électronique sont les croissants, ceux-ci étant constitués d' une membrane en association avec du matériel granuleux au niveau de sa face concave (SODEIK et al, 1993). L' expansion des croissants génère les particules immatures qui contiennent l' ADN viral associé à de nombreuses nucléoprotéines. Les particules IMV sont formées à l' issue d' un processus de maturation. Elles sont très résistantes aux stress physiques et ne sont libérées de la cellule qu' après la lyse cellulaire. Une fraction des IMV est enveloppée par des citernes dérivées du réseau trans-Golgien (SCHMELZ et al, 1994) ou d' endosomes tubulaires précoces (TOOZE et al, 1993). Les membranes qui constituent ces citernes contiennent des protéines virales, absentes de la forme IMV. La forme IMV ainsi enveloppée est appelée IEV pour « intracellular enveloped virus ». Les IEV fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer une forme virale pourvue de deux membranes. La majorité des particules ainsi extériorisées restent attachées à la membrane plasmique : elles sont appelées CEV pour « cell-associated enveloped virus » (BLASCO et MOSS, 1992). les particules libérées dans le milieu extracellulaire représentent les particules EEV. (Voir Fig 9).

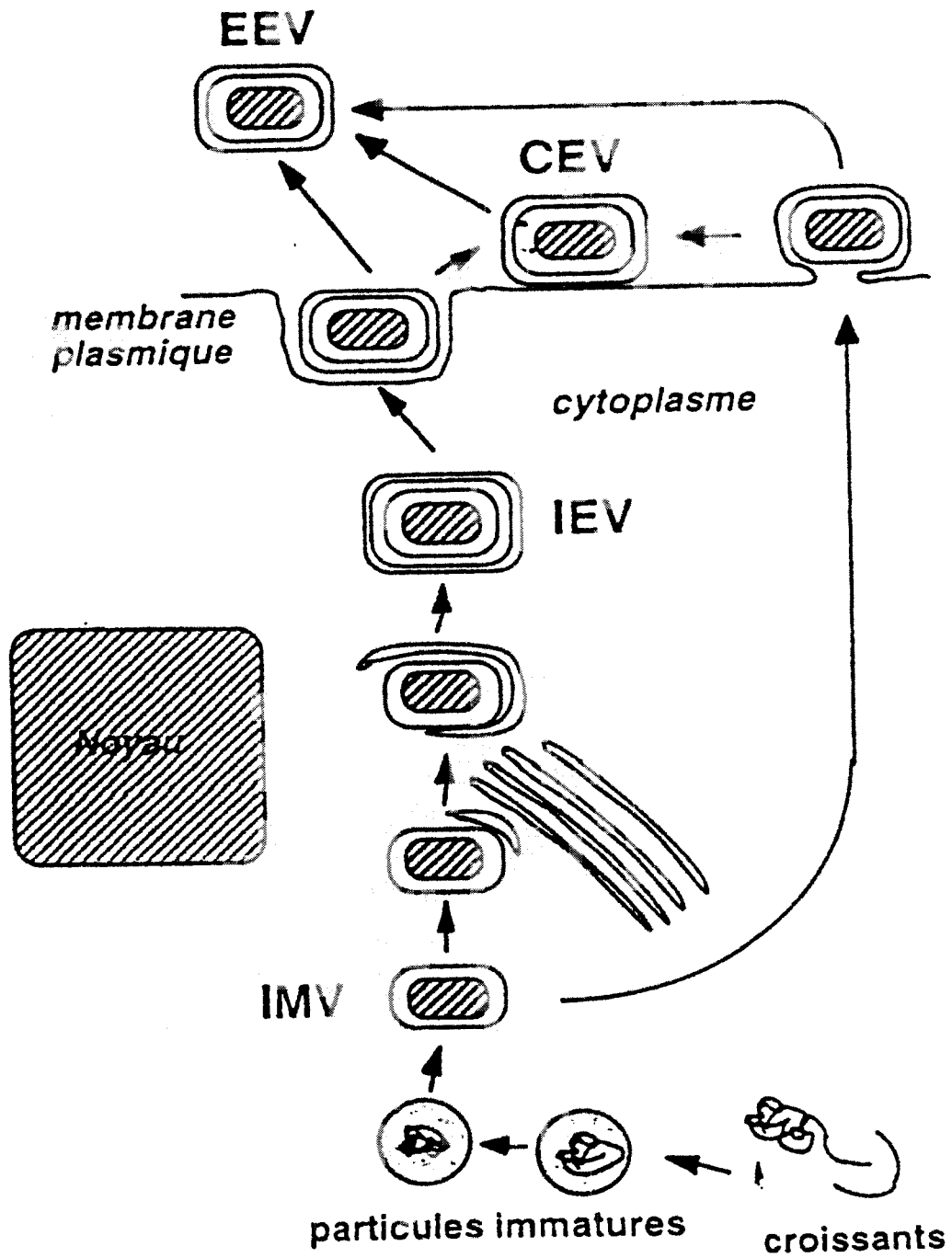


Fig 9 : Morphogénèse des particules IMV et EEV du virus de la vaccine. (VANDERPLASSCHEN et al, 1998)

Les particules EEV étant libérées activement de la cellule, elles sont responsables de la dissémination du virus *in vivo* et *in vitro* (APPLEYARD et al, 1971 ; BOULTEIX et APPLEYARD, 1973 ; PAYNE, 1980 ; PAYNE et KRISTENSSON, 1985). En culture de cellules en milieu liquide, la dissémination des EEV est révélée par la formation de plages de lyse en forme de « comètes ». L' enveloppe externe des particules EEV est une structure très fragile comme nous l' avons dit précédemment, qui est endommagée lors de la purification virale. L' étude de la pathogénie de l' infection suggère que les formes IMV et EEV ont des rôles spécifiques et complémentaires. La forme IMV qui est résistante dans le milieu extérieur, serait responsable de la transmission du virus d' un organisme à un autre, tandis que la forme EEV, dont l' enveloppe externe est très fragile, serait ainsi responsable de la dissémination du virus au sein de l' organisme infecté (VANDERPLASSCHEN 1996-1997).

♦ Rôle des protéines virales dans la formation des EEV :

Les IMV se déplacent vers la périphérie de la cellule grâce au réseau de microtubules et en présence de la protéine virale d' enveloppe A27L (SANDERSON et al, 2000). Des études portant sur des mutants du virus de la vaccine semblent indiquer que l' acquisition de l' enveloppe supplémentaire des EEV nécessite l' expression d' au moins une protéine d' IMV (A27L) (RODRIGUEZ et SMITH, 1990) et de deux protéines spécifiques d' EEV (F13L et B5R) (BLASCO et MOSS, 1991 ; ENGELSTAT et SMITH, 1993). Le gène F13L code ainsi pour une protéine de 37 kDa qui a un rôle majeur non seulement dans la formation mais aussi dans l' architecture de l' enveloppe des EEV.

DEUXIEME PARTIE :

PARTIE

EXPERIMENTALE

Introduction :

Nous venons de voir qu' il existe deux populations virales qui ont chacune leurs particularités. Ainsi, on comprend aisément l' intérêt de les étudier l' une séparément de l' autre. Le problème qui nous intéresse est que jusqu' alors les travaux précédents montrent toujours une pollution par des EEV lors de travaux d' études des IMV.

Pour le virus de la vaccine, il existe un gène viral qui code pour une protéine (F13L) qui permet à la sous population virale EEV sa formation. Ainsi lorsqu' on fabrique un virus mutant déficient en cette protéine, seules les formes IMV semblent produites par la cellule hôte. Après étude du génome du virus myxomateux et par analogie de séquences, le gène codant pour MO22L se présente comme étant le gène similaire à F13L.

C' est sur la base de ce principe que nous avons engagé notre mutagénèse dirigée , dans le but de construire et de purifier un virus mutant MO22L-, qui ne produira que des formes IMV. Une fois les formes IMV purifiées, leur étude apportera des connaissances quant à leur rôle dans l' interaction virus-cellule hôte.

Ainsi, notre but dans cette partie, sera d' exposer les différentes étapes de la mutagénèse.

Nous développerons tout d' abord les matériels et méthodes, exposerons ensuite nos résultats pour enfin les discuter.

I- Matériels et méthodes :

1- Cellules, plasmides et sérums utilisés :

La souche DH5- α d' *Escherichia coli*, conservée à -80°C , est utilisée pour la sélection et la multiplication des plasmides. Elle a été choisie selon deux critères fondamentaux : leur caractère non pathogène et l'absence de résistance à un antibiotique.

Les plasmides utilisés pour la construction définitive sont le plasmide pVAX-VP60 et le plasmide pGEM-T-MO22L. Le premier plasmide dérive du plasmide pVAX (Invitrogen) qui sert de vecteur permettant l'expression directe du transgène dans les cellules Eucaryotes et va recevoir le gène MO22L. Ce gène est porté par le second plasmide qui est un plasmide de clonage spécifique de produit de polymérisation en chaîne ou PCR nommé pGEM-T (Promega).

Le vecteur pVAX-MO22L construit à partir des deux précédents s'exprimera dans des cellules eucaryotes que sont les cellules du rein de lapin (RK13).

Le vecteur pGEMT-MO22L-GFP, construit à partir de pGEMT-MO22L et de pEGFP-F (clontech), servira à construire un virus myxomateux délété du gène MO22L.

On utilisera aussi deux sérums qui permettront de révéler l'expression du gène MO22L dans les cellules RK13. Ces sérums sont respectivement le sérum de lapin monospécifique anti-MO22L et celui de lapin polyclonal antimyxomateux. Ils sont confectionnés après vaccination contre MO22L ou contre le virus myxomateux total chez le lapin.

2- Culture des bactéries :

On peut réaliser une culture bactérienne soit en milieu liquide, soit en milieu solide sur boîte de pétri. Si on veut cultiver sélectivement certaines bactéries portant un plasmide qui contient un gène de résistance à un antibiotique, on réalise un milieu sélectif contenant l'antibiotique mélangé à du milieu LB dont la composition est en annexe 1. La température optimale de culture des bactéries *Escherichia coli* est de 37° .

Lors des manipulations avec les bactéries, il est impératif de travailler stérilement.

3- Electrophorèse horizontale d'ADN :

Il s'agit d'une électrophorèse sur gel avec 0.5% à 1.5% d'agarose (Promega) et 0.5% de bromure d'éthidium (BET) en tampon TBE (Tris-Borate EDTA). Après fusion, la solution est coulée sur support plastique. Nous n'utiliserons que du gel d' agarose à 0.7%, concentration standard moyenne.

On prépare les échantillons d'ADN avec du tampon de charge 10X (200mM de EDTA, 50% de glycérol et 0.2% de bleu de bromophénol) que l'on complète avec de l'eau Nanopure. Puis on les charge dans les puits du gel en incluant un marqueur de poids moléculaire (marqueur 1Kb Gibco BRL) dans un des puits.

L' électrophorèse aura plusieurs rôles : la quantification de la concentration du matériel, la vérification de sa taille ou poids moléculaire, sa purification en découpant la bande lui correspondant. Dans ce dernier cas, le protocole suivi correspond à celui préconisé par le fournisseur du kit Nucleospin Extract (Macherey-nagel). (Voir annexe 2).

4- Amplification par polymérisation en chaîne (PCR) :

On prépare un mélange (mix) qui sera réparti dans les tubes de réaction dans lesquels on rajoute l'ADN cible.

Préparation du mix pour 25µl de réaction :

Amorces 5' et 3' 25X (12.5µM)	1µl de chaque
Tampon 10X	2.5µl
MgCl ₂ (50mM)	0.75µl
dNTP (1mM)	1µl
Taq polymérase (5U/µl)	0.25µl
Compléter à 25µl d'eau Nanopure.	

On veille à utiliser des tubes témoins négatifs (sans ADN) et positifs (avec de l'ADN portant de façon certaine la séquence à amplifier).

Les amorces que nous avons utilisées ont été synthétisées à façon par les sociétés Isoprim. Ces amorces sont choisies de façon spécifique selon la séquence d'ADN du gène que l'on veut amplifier. Dans le cas du gène MO22L, la séquence de chaque amorce est la suivante :

Amorce 5' : 5'> : TCA GTT TTT TAC CAC CGT ATT GCG GGG ATT 3'>

Complémentaire 5'> : AAT CCC CGC AAT ACG GTG GTA AAA AAC TGA 3'>

Taille : 30 nucléotides Tm : 72°C GC% : 43 AG% : 40

Amorce 3' : 5'> : CTC TTT TTC ATG TAT TAA ATG CTA TCA CTT 3'>

Complémentaire 5'> : AAG TGA TAG CAT TTA ATA CAT GAA AAA GAG 3'>

Taille : 30 nucléotides Tm : 66°C GC% : 26 AG% : 30

Pour la GFP, la séquence de chaque amorce est la suivante :

Amorce GFP-F : 5'> : ATC ACA TGG TCC TGC TGG AGT 3'>

Complémentaire 5'> : ACT CCA GCA GGA CCA TGT GAT 3'>

Taille : 21 nucléotides Tm : 60°C GC% : 52 AG% : 47

Amorce GFP-R : 5'> : TCT ACA AAT GTG GTA TGG CTG 3'>

Complémentaire 5'> : CAG CCA TAC CAC ATT TGT AGA 3'>

Taille : 21 nucléotides Tm : 58°C GC% : 42 AG% : 52

Une fois hybridées à l'ADN qui a été préalablement dénaturé, elles permettent l'initiation de l'activité de l'ADN polymérase (ici, Taq polymérase isolée de la bactérie *Thermophilus aquaticus* qui survie à de fortes chaleurs). L'ADN polymérase sert à l'élongation du brin complémentaire.

On réalise 30 cycles d'amplification identiques dans un thermocycleur Perkin-Elmer modèle 2600 précédés d'une étape de destruction des bactéries contenant l'ADN et de dénaturation à 94°C pendant 4 min.

Puis les 30 cycles d'amplification débutent et comprennent différentes phases :

30 secondes à 94°C

30 secondes d'hybridation à une température compatible avec le Tm (soit 55°C dans notre cas).(*)

30 secondes d'élongation à 72°C

(*)T_m est la température de fusion calculée en fonction du nombre de bases (Guanine, Cytosine, Adénine, Thymine) suivant le formule :

$$T_m = 4x (G+C) + 2x (A+T)$$

On dépose sur gel d'agarose à 0.7%, 5µl de chaque produit PCR.

5- Préparation d'ADN plasmidique :

Deux techniques sont utilisées : la minipréparation (miniprep) et la préparation en grand volume ou maxiprep.

a- Préparation d'ADN par Miniprep :

On cultive une colonie de bactéries, à 37°C pendant toute une nuit, dans 2ml de LB contenant l'antibiotique approprié. On centrifuge à 12,000g pendant 30 secondes à 4°C. Le culot est repris dans 100µl de solution I glacée (50mM glucose, 25mM Tris Cl à pH8.0 et 10mM EDTA à pH8.0). Puis on ajoute 200µl de solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS), et enfin 150µl de solution III (5M acétate de potassium, acide acétique glacial, eau). On centrifuge à 12000g pendant 5 minutes à 4°C. On garde le surnageant auquel on ajoute un volume équivalent de phénol chloroforme. Après centrifugation à 12000g pendant 2 minutes à 4°C, on récupère le surnageant que l'on fait précipiter avec 2 volumes d'éthanol 100%. On laisse l'ensemble en milieu ambiant pendant 2 minutes puis on centrifuge à 12000g pendant 5 minutes à 4°C. Puis on rince l'ADN du culot avec 1ml d'éthanol à 70% à 4°C et on centrifuge dans les mêmes conditions que précédemment. On enlève le surnageant et on laisse sécher le culot d'ADN plasmidique sous la hotte pendant 5 minutes. Finalement, on le dissout dans 50µl d'eau Nanopure ou de TE (10mM Tris Cl pH8 et 0.1mM EDTA). La solution peut être conservée à -20°C.

b- Préparation d'ADN en grand volume sur colonne Qiagen : (Voir annexe 3)

Le protocole est fondé sur une procédure de lyse alcaline des cellules. Puis l'ADN plasmidique se fixe à la résine échangeuse d'anion de la colonne Qiagen dans des

conditions de pH et des concentrations de sels appropriés. Un lavage dans un milieu salé permet d'enlever les ARN, les protéines, les colorants et les impuretés de faible poids moléculaire. L'ADN plasmidique est élué dans un tampon à forte concentration en sels. Il est alors concentré et précipité dans de l'isopropanol.

6- Construction d'un ADN recombiné :

Dans le clonage de l'ADN, un fragment d'ADN contenant un gène d'intérêt est inséré dans le génome purifié d'un élément génétique capable d'autoréplication (un plasmide par exemple). On obtient alors une molécule d'ADN recombinant qui peut être introduite dans une bactérie compétente par transformation. En partant d'une seule molécule d'ADN recombinant infectant une seule cellule, les systèmes de réplication normaux du plasmide peuvent permettre de produire plus de 10^{12} molécules d'ADN plasmidiques identiques en moins de 24 heures, et donc d'amplifier la quantité de gène d'intérêt par un même facteur. Le plasmide utilisé est appelé vecteur de clonage, et l'ADN ainsi amplifié grâce à cette insertion est dit ADN cloné.

En cas de clonage d'un produit PCR, on peut utiliser le vecteur pGEM-T (Promega). Ce vecteur possède au niveau du site de clonage des thymidines terminales, cohésives avec les extrémités Adénylées créées par la plupart des polymérases thermostables. Le clonage n'est cependant pas orienté.

a- Digestion d'ADN plasmidique :

La digestion se fait grâce à des enzymes de restriction qui coupent la double hélice d'ADN au niveau de sites spécifiques définis par une séquence nucléotidique particulière, produisant des fragments d'ADN double brin de taille strictement définie. En comparant les tailles des fragments d'ADN produits à partir d'une région génétique particulière après traitement avec un mélange de différentes enzymes de restriction, une carte de cette région peut être établie, montrant la localisation de chaque site de coupure (de restriction) par rapport aux sites de restriction voisins. L'ADN est digéré avec une unité d'enzyme par μg d'ADN dans le tampon 10X approprié. La digestion peut se faire sur une durée de une heure à toute une nuit en général à 37°C .

b- Ligation :

Elle permet d'ajouter un fragment d'ADN (un insert) à un vecteur ouvert (un plasmide digéré par exemple). Dans le cas où le rapport désiré insert sur vecteur est de trois, la formule permettant de calculer la quantité d'insert est la suivante :

$$\text{Quantité d'insert (en ng)} = \text{quantité de vecteur (ng)} \times \frac{\text{taille de l'insert (en pb)} \times 3}{\text{taille du vecteur (en pb)}}$$

Les bases des extrémités cohésives monocaténares de chaque fragment doivent s'apparier par complémentarité grâce à des liaisons hydrogènes. Lors de l'appariement, l'ADN ligase (une enzyme) catalyse la formation de liaisons covalentes entre les extrémités. Il en résulte un ADN recombiné.

Souvent on réalise un témoin négatif de ligation sans insert.

Dans notre cas, nous avons systématiquement préparé deux tubes de 10µl de solution au total.

Ligation	Témoin
2µl Vecteur (50ng)	2µl Vecteur (50ng)
2.5µl Insert (50ng)	0µl Insert
1µl Tampon (10X)	1µl Tampon (10X)
1µl Ligase (5U /µl)	1µl Ligase (5U /µl)
3.5µl H2O	6µl H2O

On réalise la ligation à 14°C pendant une nuit.

Le tampon de ligation 10X utilisé contient : 5mM ATP, 300mM TrisCl pH7.8, 100mM MgCl₂ et 100mM DTT.

7- Préparation de bactéries compétentes :

Escherichia coli (souche DH5- α) est cultivée sur la nuit dans 3ml de milieu LB. On ensemence 50ml de milieu LB contenant 20mM MgSO_4 avec la totalité de cette pré-culture. On laisse la culture croître jusqu'à ce que la densité optique à 600nm soit comprise entre 0.5 et 0.8. Les cellules sont laissées dans la glace 30 min, puis elles sont centrifugées 5 min à 4°C à 2000g. On suspend les cellules du culot dans 10ml de CaCl_2 100mM froid et on laisse 60 min dans la glace, puis on centrifuge 5 min à 2000g à +4°C. Le culot est resuspendu dans 2ml de CaCl_2 100mM froid. Les bactéries sont alors compétentes pour la transformation.

8- Transformation :

La transformation dépend de la qualité des bactéries, du respect des temps de chaque étape du protocole et du soucis du travail au froid.

L'ADN plasmidique (10 à 100ng) est mélangé à 200 μ l de bactéries compétentes à 4°C (dans la glace). Puis on met à incuber 20 minutes dans la glace. On procède ensuite à un choc thermique en incubant 45 secondes à 42°C et on remet dans la glace pendant 2 minutes. On relance la culture de bactéries dans 800 μ l de milieu non sélectif (milieu LB) pendant une heure à 37°C. On concentre la solution de bactéries en centrifugeant et en ôtant le surnageant puis on resuspend dans 200 μ l de milieu LB. 100 μ l de bactéries sont finalement étalées sur une boîte LB-agar + antibiotique de sélection (100 μ g/ml d'ampicilline ou 50 μ g/ml de kanamycine).

9- Transfection :

a- Formation des complexes ADN-liposomes :

On prépare deux tubes en polystyrène dont la charge n'attirera pas les liposomes (lipofectamine, Gibco BRL). L'un contient entre 3 et 5 μ g de plasmides à transférer dans 100 μ l de milieu optiMEM (milieu essentiel minimum optimisé pour la transfection de cellules eucaryotes Brevet Gibco BRL) et l'autre tube qui sert de témoin négatif ne contient que de l'optiMEM sans ADN. On ajoute dans chaque tube 40 μ g de

lipofectamine diluée dans 100 µl d' optiMEM. On laisse les complexes se former pendant 20 minutes à température ambiante. Il faut s' assurer que le témoin reste clair(pas de complexe) contrairement à la solution de l' autre tube qui doit devenir légèrement opalescente, correspondant à la formation de complexes suffisamment fins.

La confluence des cellules RK 13 (cellules épithéliales de rein de lapin), dans lesquelles on va transfecter le plasmide, est vérifiée sous microscope. Elles baignent dans un milieu DMEM (milieu essentiel minimum modification de Dubbelco) contenant des antibiotiques (pénicilline 100 U/ml final et streptomycine 10 µg/ml final) et 10 % de sérum fœtal de veau. Elles ne doivent présenter que 80 % de confluence de façon à :

- ne pas être en inhibition de contact et donc être en métabolisme actif
- limiter les fluorescences non spécifiques lors de la révélation par immunofluorescence.

b- Transfection proprement dite :

Les cellules cultivées en boîte de pétri sont lavées trois fois avec 3 ml de milieu optiMEM sans sérum. Après avoir ajouté aux 200 µl de tubes 2.8 ml de milieu optiMEM, le contenu des tubes est déposé sur les cellules. La durée de transfection est de cinq heures minimum à 37 ° c en incubateur CO2.

Après ce temps, on ajoute 3 ml de milieu optiMEM contenant 4 % de sérum de veau fœtal afin d' obtenir un milieu à 2 % de sérum de veau fœtal permettant le maintien des cellules pendant 48 heures à 37 ° c en incubateur CO2.

10- Immunofluorescence :

a- Fixation des cellules :

Le milieu de maintien est éliminé et les boîtes sont rincées deux fois avec 3 ml de PBS (phosphate buffer saline).

Puis les cellules sont fixées dans un mélange alcool-acétone 1/1 froid pendant deux heures minimum à -20 ° c.

b- Révélation par immunofluorescence :

L' alcool-acétone est éliminé, puis les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS. Elles sont mises à incuber avec le sérum adapté (par exemple du sérum de lapin polyclonal hyperimmun anti virus myxomateux au 1/500^{ème} dans du PBS) pendant 60 à 120 minutes à 37 ° c. Ensuite, après avoir réalisé trois lavages avec du PBS Tween (0.05 %), les cellules sont mises à incuber avec du sérum de chèvre anti Ig G de lapin couplé FITC (isothiocyanate de fluorécéine) pendant 60 minutes à 37 ° c. Après ceci, trois lavages PBS Tween sont effectués suivis d' un lavage extensif à l' eau du robinet. Après cette dernière étape, les cellules peuvent être observées au microscope à fluorescence.

11- Construction et sélection des virus mutants :

Des cellules RK 13 de 24 heures, à 90 % de confluence, cultivées en boîte de pétri de 60 mm, ont été infectées par 0.03 à 0.04 ufp/cellule de virus T1.

Après deux heures d' adsorption à 37 ° c, l' inoculum viral est éliminé et les cellules lavées deux fois avec de l' optiMEM (Gibco BRL) sans sérum. Les mélanges de transfection additionnés de 3 ml d' optiMEM sans sérum, sont alors ajoutés aux cellules. Ces mélanges de transfection comprennent 10 µg de pGEMT-MO22L-GFP, préalablement mélangés pendant 20 min à 40 µg de lipofectamine à température ambiante. L' ensemble est laissé à 37 ° c pendant 5h30, puis complété par 3 ml d' optiMEM à 5 % de sérum de veau fœtal (SVF), puis remis à l' étuve (37° c). Après 48 heures, les cellules subissent trois cycles de congélation-décongélation et 20 secondes de sonication (puissance maximale, sonicateur B15 Branson), puis les lysats sont étalés sur de nouvelles cellules RK 13 de 24 heures, en présence de milieu optiMEM à 2 % SVF.

Deux jours plus tard, le milieu liquide est remplacé par un milieu gélosé (MEME 2X, agarose LM 1 % et SVF 2.5 %). Notre virus mutant comprenant la cassette GFP (Green Fluorescent Protein), on sélectionne, au microscope à fluorescence, les plaques fluorescentes qui signalent la présence du virus mutant. Chaque plaque fluorescente est donc prélevée et diluée dans du DMEM à 2.5 % SVF afin d' être réétalée, après congélation-décongélation et sonication, sur cellules RK 13. Après cinq cycles de

purification sous agarose LM à 1 %, les virus recombinants sont amplifiés sur cellules RK 13.

12- Extraction d' ADN viral :

L' extraction d' ADN viral est réalisée selon les recommandations du fournisseur ROCHE avec le Kit high pure PCR DNA. (Voir annexe 4).

13- Immunisation des lapins :

Pour procéder à l' immunisation des lapins, on utilise des lapins mâles âgés de dix semaines.

L' immunisation est réalisée directement avec de l' ADN plasmidique.

On fait au total sept injections d' ADN. Pour chaque injection, on utilise 200 à 500 µg de vecteur pVAX-MO22L, dans un volume d' environ 200 µl par voie intradermique.

Le protocole a été le suivant :

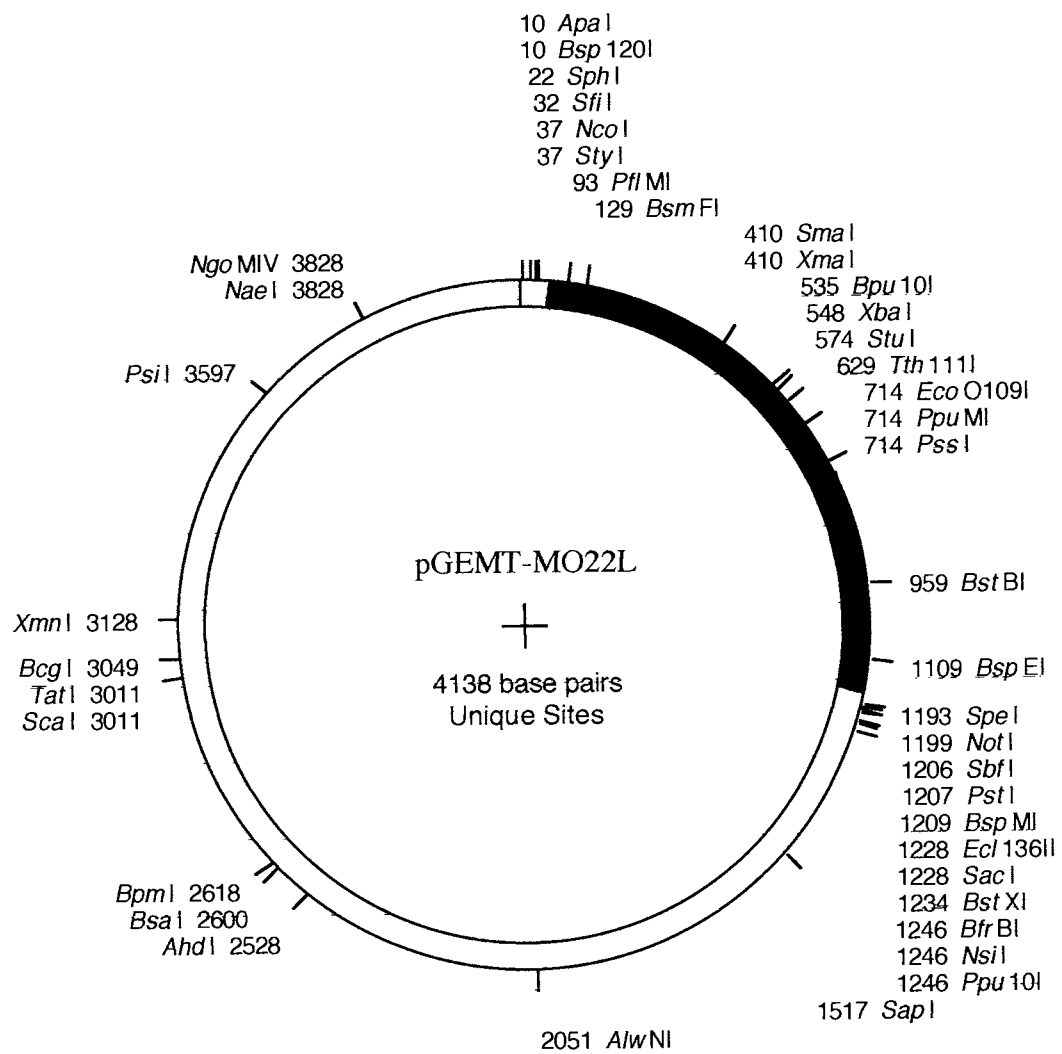
- quatre injections à une semaine d' intervalle.
- Puis trois injections à deux mois d' intervalle.

Ensuite, après la sixième et la septième injection, nous réalisons une prise de sang aux lapins afin d' obtenir du sérum qui est testé en immunofluorescence. Seuls les sérums positifs en immunofluorescence sont utilisés.

II- Résultats :

1- Construction des plasmides :

Notre objectif est d' obtenir uniquement des formes IMV purifiées. Pour ce faire, il est nécessaire de construire un virus mutant MO22L-, n' exprimant plus cette protéine et donc n' exprimant plus d' EEV.



■ base 72 à 1187 : gène MO22L.

Fig 10 : Carte de restriction du plasmide pGEMT-MO22L.

Nos outils indispensables pour aboutir à cette ultime étape sont un plasmide de transfert et un plasmide d' expression.

a- Plasmide de transfert :

Le plasmide de transfert, nous sert à cloner le gène MO22L afin de pouvoir réaliser une recombinaison homologe, en cellule eucaryote, entre le virus sauvage et ce plasmide pour inactiver MO22L et obtenir un virus mutant MO22L-.

Ce plasmide est le plasmide pGEMT-MO22L-GFP. En effet, on utilise le vecteur pGEMT qui est un plasmide de clonage spécifique de produit PCR. On fait une ligation classique avec l' insert MO22L obtenu par PCR. On connaît la séquence de la partie codante du gène MO22L (voir Annexe 5), et donc sa carte de restriction, avec les sites de restriction. Le plasmide ainsi formé, pGEMT-MO22L (Voir Fig 10), subi une digestion par Sma I, afin de l' ouvrir au niveau du gène MO22L. On y insère ensuite le gène nommé GFP (pour Green Fluorescent Protein) rendu bout franc. Pour cela, le gène de la GFP issu du plasmide pEGFP-F (Voir annexe 6), a été sous cloné dans un plasmide d' expression poxvirale afin d' y joindre un promoteur spécifique des Poxvirus (PVV : promoteur spécifique). On obtient ainsi notre vecteur de transfert pGEMT-MO22L-GFP. (Voir fig 11). On utilise la protéine GFP pour pouvoir sélectionner le résultat de la recombinaison homologe par fluorescence naturelle de la cellule infectée par le virus exprimant le gène GFP.

Toutes les vérifications, après ligation et digestion, se font par électrophorèse sur gel d' agarose à 0.7 %.

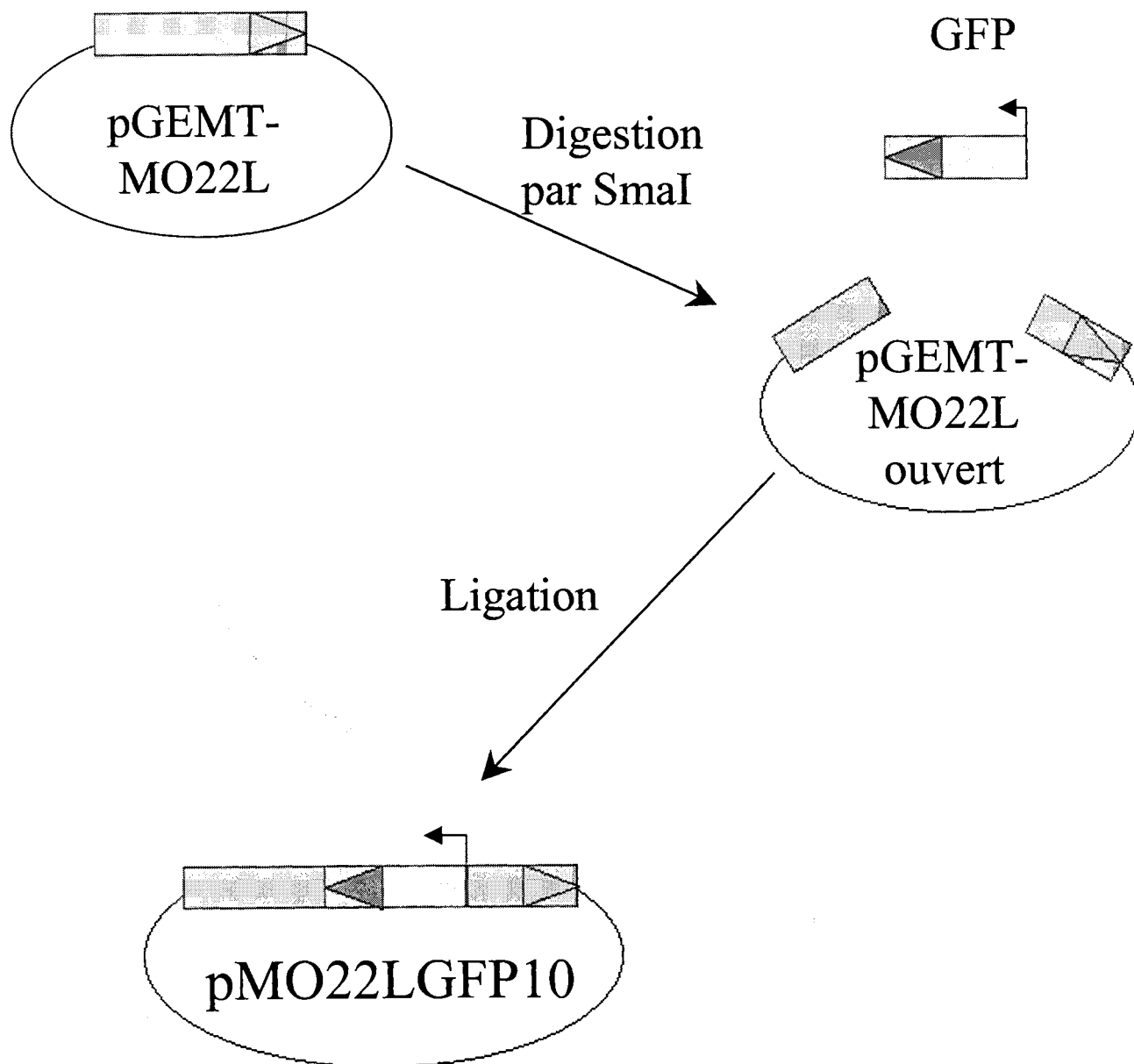


Fig 11 : Construction du plasmide de transfert pGEMT-MO22L-GFP.

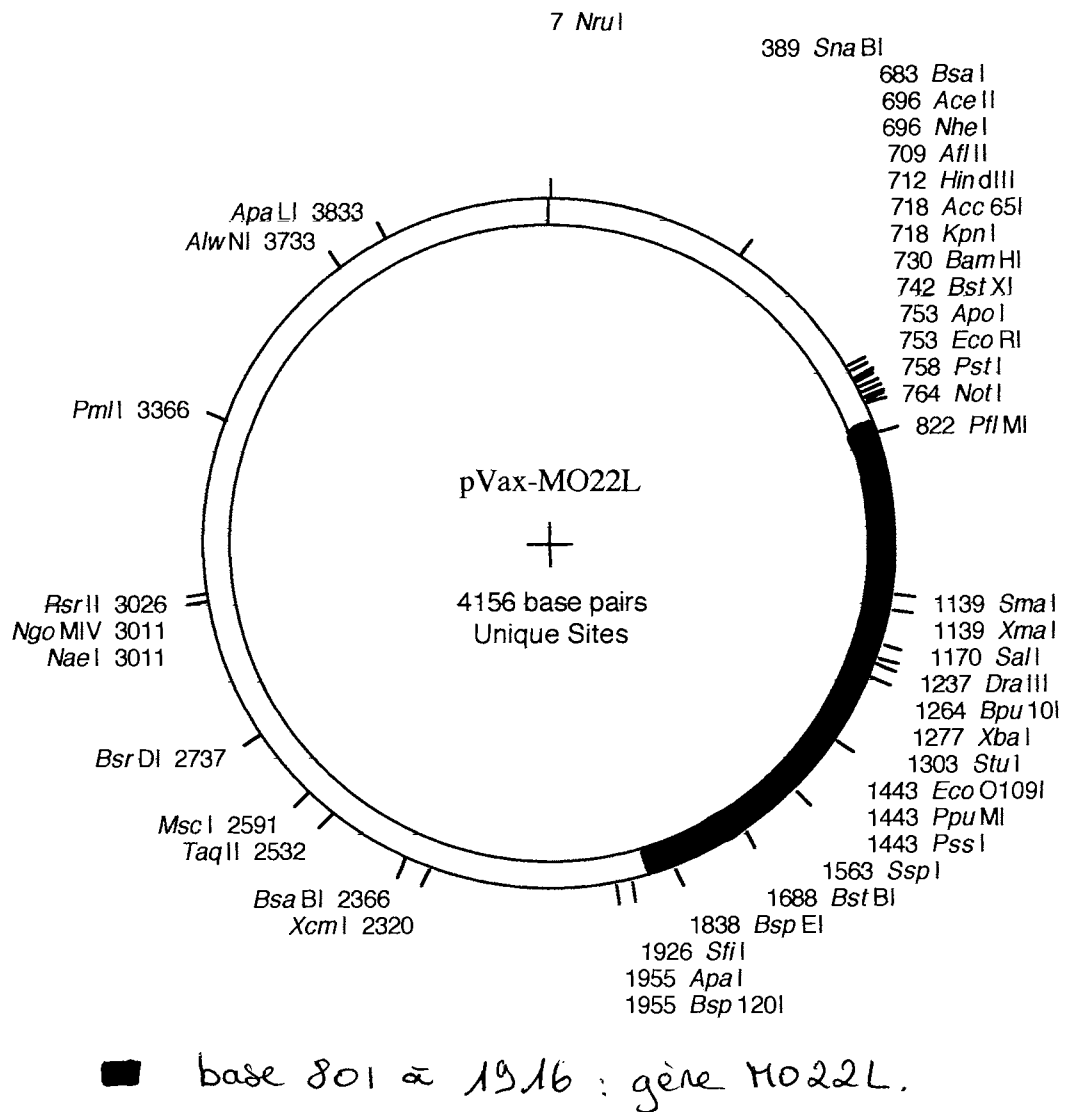


Fig 12 : Carte de restriction du plasmide d' expression pVAX-MO22L.

b- Plasmide d' expression :

Le plasmide d' expression est le plasmide pVAX-MO22L (Voir Fig 12). on cherche à transférer le gène MO22L dans le plasmide pVAX car celui-ci permet une expression du transgène dans les cellules eucaryotes.

Nous partons, pour cela du plasmide pVAX-VP60, c' est à dire le plasmide pVAX auquel on a rajouté un fragment d' ADN de 2 Kpb entre les deux sites d' action des enzymes de restriction spécifiquement choisies dans la zone de clonage. Son utilisation permet de s' assurer que les deux enzymes ont bien digéré l' ADN. Si c' est le cas, on devrait obtenir, après électrophorèse sur gel d' agarose, un fragment de 3 Kpb correspondant à pVAX et un fragment de 2 Kpb pour VP 60.

On réalise l' ouverture du plasmide par digestion à l' aide de deux enzymes de restriction, Apa 1 et Pst 1, choisies de façon à ce qu' elles puissent couper sur le site de clonage des plasmides pVAX-VP60 et pGEMT-MO22L. la digestion aboutit donc à deux fragments d'ADN : le plasmide pVAX seul (de 3 Kpb) et celui de la séquence rajoutée de 2 Kpb. On procède à une électrophorèse et on extrait du gel d' agarose la bande correspondant à pVAX. On obtient ainsi le vecteur prêt à recevoir le gène MO22L.

Parallèlement, on met en culture des bactéries qui contiennent le plasmide pGEMT-MO22L dans un milieu sélectif LB additionné d' ampicilline puis on extrait et on purifie l' ADN plasmidique. Le plasmide est digéré sous l' action des enzymes Apa 1 et Pst 1. On obtient, après électrophorèse, un fragment de trois Kpb correspondant au plasmide pGEMT et un fragment d'un Kpb correspondant au gène MO22L. On extrait la bande correspondant à MO22L , ce fragment constitue donc l' insert prêt à la ligation.

On procède donc à la ligation entre MO22L et pVAX, ainsi est obtenu notre plasmide d' expression. Voir fig 12.

2- Construction du virus mutant MO22L- :

Le virus mutant MO22L- est obtenu après recombinaison homologue entre le plasmide de transfert et le génome du virus sauvage dans une cellule eucaryote.

a- Schéma général de recombinaison :

On infecte par le virus T1 sauvage et on transfecte les cellules eucaryotes RK13 par le plasmide de transfert pour provoquer une recombinaison homologue et ainsi obtenir le virus mutant recherché (Voir fig 13). Le taux de recombinaison, dans ces conditions est de 1/10000 à 1/100000.

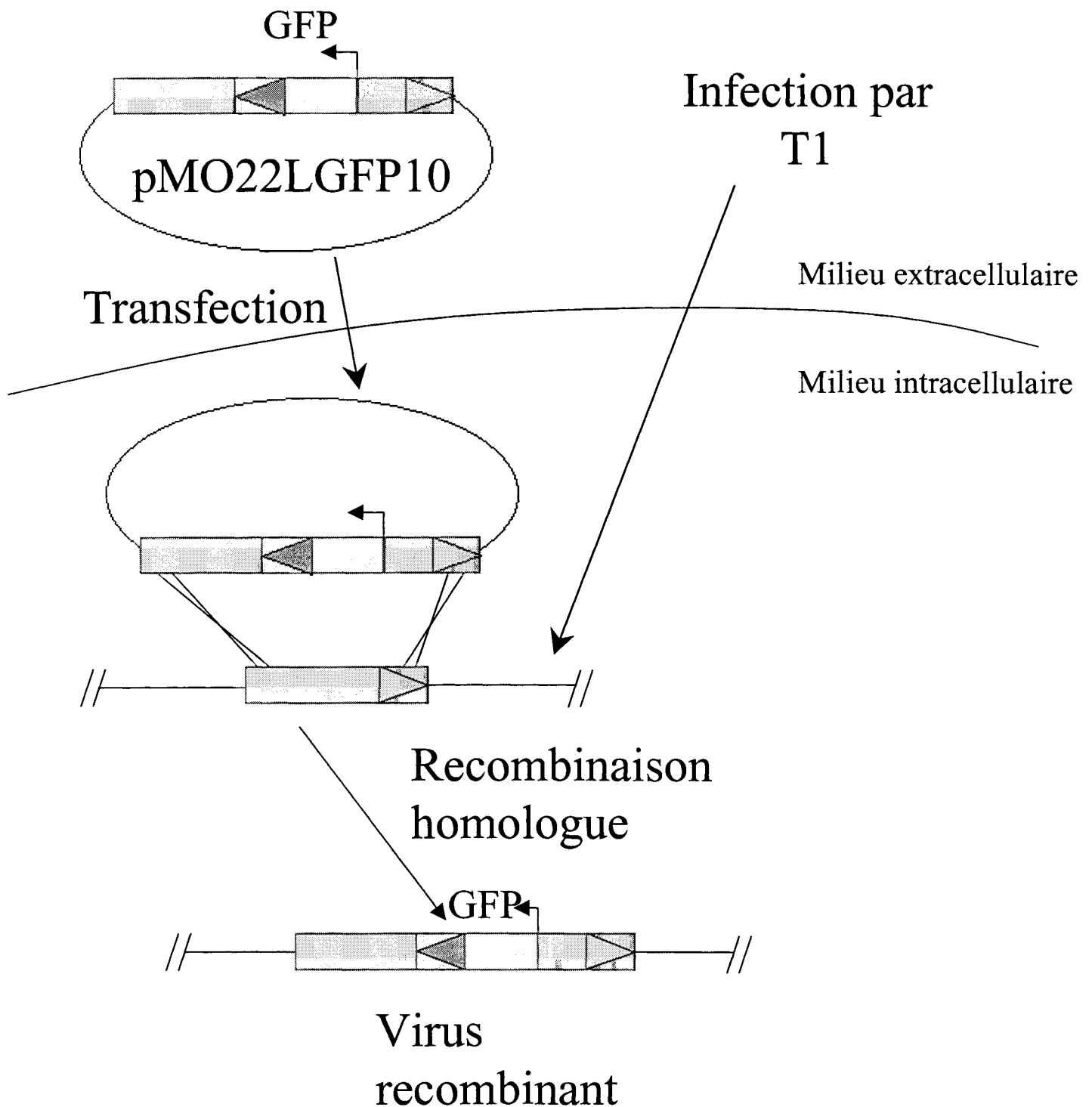


Fig 13 : Construction du virus mutant MO22L-.

b- Obtention de plages fluorescentes :

Le virus mutant comprend la cassette GFP.

Les plages fluorescentes qui signalent donc la présence du virus mutant sont sélectionnées en microscopie à fluorescence (Voir Photo 3).

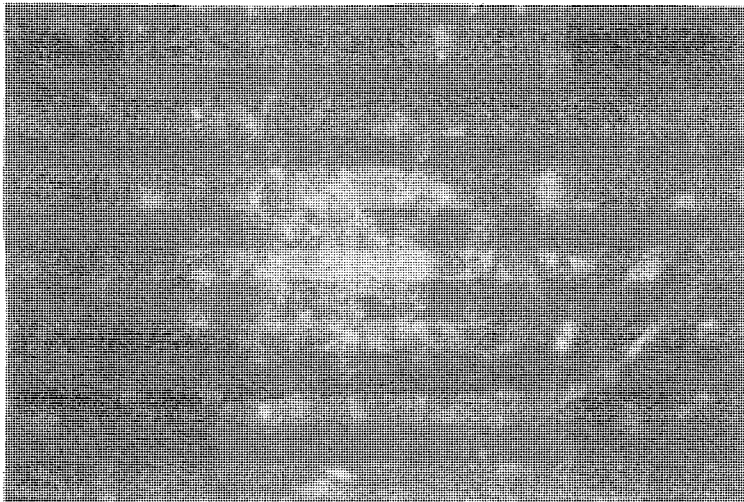


Photo 3 : Photographie de fluorescence en microscopie.

Afin d'essayer de purifier le virus recombinant, on dissocie le plus possible les particules virales par différents traitements :

- passage des suspensions virales dans une cuve à sonication,
- passage de la suspension mère virale à l'aiguille,
- et enfin, dilution pour obtenir des plages isolées.

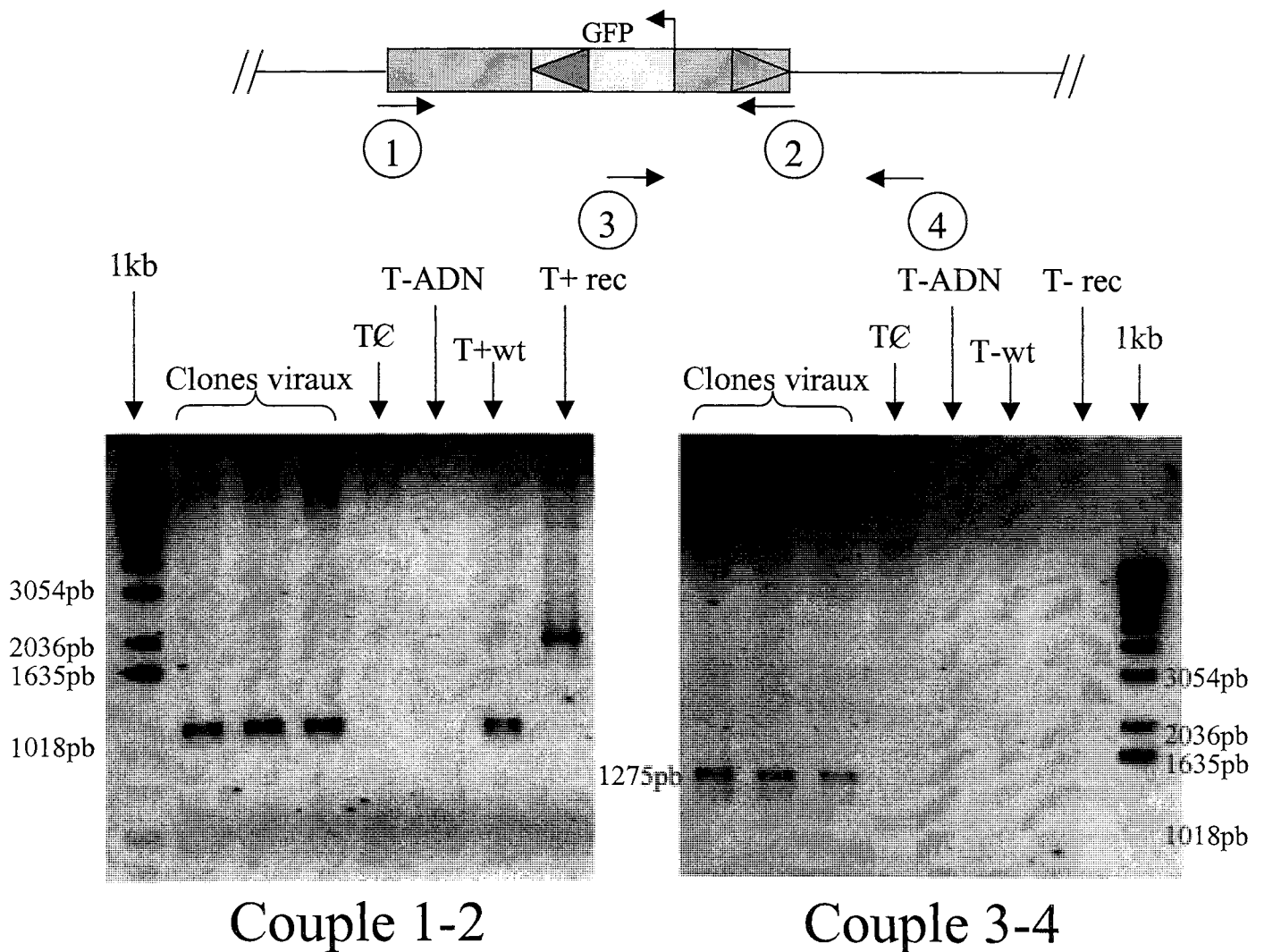
A la fin de toutes les étapes de sélection-étalement (5-6), on obtient un tapis cellulaire infecté complètement fluorescent. Ceci laisse supposer l'obtention d'un virus mutant pur.

c- Vérification des plages sélectionnées :

On prélève des plages fluorescentes (donc qui contiennent le virus recombinant).

Chaque plage prélevée est rediluée et ré-étalée sur cellules RK13 (cellule de lapin) après congélation-décongélation et sonication. Les cellules infectées sont récoltées et l'ADN total est purifié (à l'aide du kit high pure PCR kit) puis on fait une PCR afin de

vérifier la pureté du virus recombinant. Pour ce faire, on utilise les amorces précédemment décrites dans le paragraphe matériel et méthodes. La réaction croisée sert à la vérification de la construction (GFP bien placé), tandis que la réaction utilisant les amorces internes sert à la vérification de la pureté. (Voir Fig 14).



TC : Témoin négatif constitué d' ADN extrait de cellules non infectées.

T-ADN : Témoin négatif constitué d' eau.

T wt : Témoin positif constitué de l' ADN du virus sauvage T1. Taille théorique attendue : 1136 pb.

T rec : ADN du plasmide pGEMT-MO22L-GFP, taille théorique attendue : env 2kb.

Fig 14 : Vérification de la présence et de la pureté du mutant recombinant par PCR.

Conclusion :

La présence du virus recombinant a bien été constatée, cependant il n'est pas pur. On trouve encore des bandes correspondant à la taille du gène MO22L du virus sauvage.

Afin de pousser la purification, nous allons rajouter un deuxième critère de sélection : MO22L-, au premier critère qui était GFP+. Pour réaliser cette sélection, il nous faut obtenir des anticorps anti-MO22L.

3- Obtention d'un sérum spécifique de MO22L :

On veut donc obtenir un sérum spécifique de MO22L. Pour cela, on utilise le vecteur d'expression pVAX-MO22L car ce vecteur permet une expression directe du gène d'intérêt dans les cellules eucaryotes et l'obtention d'un sérum chez le lapin par injection de l'ADN.

a- Résultat de la transfection simple :

On réalise une transfection simple pour vérifier l'expression du vecteur en cellule eucaryote. On procède à la transfection du vecteur pVAX-MO22L dans des cellules de rein de lapin, les cellules RK13. La transfection est réalisée avec 6 µg d'ADN. En effet, on note que 3 µg sont insuffisants pour voir correctement la fluorescence et que 9 µg entraînent un effet toxique. Cette toxicité, lorsque pVAX est en quantité trop importante, peut s'expliquer par une production trop grande de protéines ou par une formation trop importante de complexe lipofectamine-plasmide d'ou une toxicité mécanique sur la membrane cellulaire.

Avec une quantité de 6 µg d'ADN, les cellules transfectées sont révélées grâce à un sérum polyclonal anti-myxo. Le résultat obtenu montre que le gène est correctement exprimé.

On a donc une bonne expression de MO22L en cellule RK13 de lapin. Ceci nous permet de passer à l'étape suivante : l'injection du plasmide aux lapins par voie intradermique.

b- Immunisation des lapins : obtention d'un sérum spécifique :

C'est le vecteur pVAX-MO22L qui permet d'obtenir un sérum spécifique anti-MO22L après inoculation de l'ADN directement aux lapins.

Après immunisation des lapins pendant sept semaines, on réalise une prise de sang. Les sérums sont ensuite testés par immunofluorescence. Le sérum a été testé en parallèle avec un sérum polyclonal. Dans les deux cas, on obtient une fluorescence. Le sérum a été testé à plusieurs taux de dilution. En allant jusqu' au 1/100 ème , on obtient une bonne fluorescence.

Ainsi, nous avons obtenu un sérum spécifique anti-MO22L, utilisable dans le cadre de la purification du virus mutant.

III- Discussion-Conclusion:

Notre objectif, à terme, était donc de pouvoir étudier les formes IMV seules. Ceci était un problème puisque pour tous les travaux précédents, il existait un obstacle commun qui était la pollution par les formes virales EEV et CEV. Par analogie avec le virus de la vaccine, on a découvert chez le virus de la myxomatose, un gène codant pour une protéine indispensable à la formation d' EEV. Ce gène est le gène codant pour la protéine MO22L. Ainsi notre objectif se résumait à fabriquer un virus mutant déficient en ce gène. Ce virus ne permettrait donc plus que la formation des formes virales IMV. Pour ce faire, on infecte des cellules eucaryotes RK13 par le virus sauvage T1 et on les transfecte simultanément par le plasmide de transfert. On obtient ainsi un virus mutant MO22L-. Son obtention est vérifiée par fluorescence. Cette technique étant très fiable, nous pouvons dire que la recombinaison a bien eu lieu. Cependant, notre virus mutant n' est pas pur : on trouve encore des traces de virus sauvage. Comment expliquer ce phénomène ?

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

Tout d' abord, les particules virales ne sont peut-être pas assez dissociées. C' est pourquoi, nous avons procédé à une sonication et un passage à l' aiguille fine des suspensions virales pour dissocier les cellules suivies d' une sélection classique des plages. Le résultat de cette manipulation a été insatisfaisant. Nous avons alors utilisé la méthode de dilution limite c' est à dire : sonication, comptage des cellules et dilution de telle sorte qu' il ne reste, statistiquement, plus qu' une cellule par plage. Cependant après de telles précautions, il n' y a aucun clone pur.

Il peut y avoir eu contamination extérieure. Pour pallier à ce problème, les cellules infectées ont été sélectionnées non pas par un manipulateur mais à l' aide d' un trieur de cellules qui compte les cellules individuellement. Ceci permet de diminuer le risque d' erreur lors des prélèvements des plages qui nous intéressent. Nous avons utilisé le trieur avec un seul critère de sélection : la fluorescence. En effet, le trieur sélectionne les cellules ayant comme caractère GFP+, ce qui est le cas pour les cellules hébergeant notre virus mutant. La sélection n' est peut-être pas assez fine, c' est pourquoi nous avons voulu obtenir des anticorps anti-MO22L. Ainsi, avec ces

anticorps, il sera possible de faire un double criblage à l' aide du trieur: GFP+ et MO22L-. L' anticorps sera associé à la rhodamine qui le révélera en rouge. La recherche sera ainsi affinée.

Afin d' obtenir les anticorps anti-MO22L, nous avons utilisé notre vecteur d' expression pVAX-MO22L et procédé à la « technique du vaccin d' ADN ». Cette technique s' est révélée productive et nous a permis d' obtenir un taux d' anticorps anti-MO22L satisfaisant. Il reste encore à le tester par le trie automatique.

La deuxième hypothèse que l' on peut avancer pour expliquer l' impureté de notre virus mutant est l' existence de coinfection. La coinfection est le mélange de deux virus. On sait à l' heure actuelle que la coinfection théorique entre deux virus de phénotype sauvage est d' environ soixante-six pourcent (GELFI, communication personnelle).

Comment expliquer une telle situation ?

Tout d' abord cette coinfection peut être le fruit du hasard lors de notre expérience. Si tel est le cas, alors le double criblage suffira à éliminer ce problème.

Mais cette coinfection peut aussi être liée au cycle viral du virus myxomateux ou bien au fait que notre virus mutant n' est peut-être pas viable seul. En effet, si le gène codant pour la protéine MO22L est impliqué d' une façon ou d' une autre, obligatoire, et jusqu' alors inconnue, dans la viabilité ou l' infectiosité du virion, le virus ainsi déficient ne peut exister qu' en « association » avec le virus sauvage. En effet, le virus sauvage permettra une transcomplémentation du virus mutant, et donc de restaurer son caractère infectieux.

Si cela est possible, une fois le virus mutant purifié, on ne pourra obtenir que des formes IMV. Ceci nous permettra d' une part, de comprendre les modalités d' interactions précoces hôte-virus myxomateux en explorant les étapes précoces de l' interaction virus-cellule cible. Ceci passera par la caractérisation des protéines virales impliquées dans l' adsorption et la pénétration du virus dans les cellules cibles, ainsi que les modes de pénétration respectifs des deux formes virales. Enfin à terme nous pourrons tenter d' identifier les récepteurs cellulaires potentiels du virus. D' autre part, on tentera de comprendre le déterminisme de la morphogénèse du virus myxomateux et d' identifier le rôle potentiel de chaque forme virale dans la pathologie associée.

Enfin, l'objectif final est d'utiliser le virus myxomateux comme vecteur de gènes d'intérêt vaccinal dans des espèces animales non cibles (vecteur non réplicatif). Ceci peut présenter un intérêt majeur dans la lutte contre certaines maladies infectieuses pour lesquelles les vaccins classiques sont soit inefficaces soit économiquement non viables.

Annexes :

Annexe 1 : Composition du milieu LB.

Annexe 2 : Protocole du kit Nucleospin extract.

Annexe 3 : Protocole de préparation d' ADN plasmique en grand volume sur colonne Quiagen.

Annexe 4 : Protocole d' extraction d' ADN viral (kit high pure PCR DNA).

Annexe 5 : Carte de restriction du gène MO22L.

Annexe 6 : Information sur le plasmide pEGFP-F.

Annexe 1 :

Composition du milieu LB :

Dans un litre de milieu LB (Luria-Bertani Medium), on ajoute à 950 mL d' eau

Nanopure : 10 g bacto-tryptone

5 g bacto-yeast extract

10 g de NaCl

Secouer jusqu' à ce que les solutés soient complètement dissous.

Ajuster à pH 7 avec du NaOH 5N (soit environ 0.2 mL)

Ajuster le volume de la solution à un litre avec de l' eau Nanopure

Stériliser la solution en autoclavant pendant 20 minutes à 15 lb :sq en cycle liquide.

Annexe 2 :

- 1 Take a clean scalpel to excise the DNA fragment. Excise only gel containing the fragment to minimize the gel volume. Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

- 2 For each 100 mg agarose gel add 300 µl NT1.
For gels containing > 2% agarose, add double the volume of buffer NT1. The maximum amount of gel slice per NucleoSpin® Extract column is 400 mg or 200 mg of a high percentage gel > 2% which requires 2 loading steps in step 4.

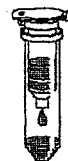


+ 300 µl NT1

- 3 Incubate sample at 50°C until the gel pieces have been dissolved (5-10 min). Vortex the sample every 2-3 min briefly.

10 min,
50°C

- 4 Place a NucleoSpin® Extract column into a 2 ml collecting tube and load the sample.



load sample

- 5 Centrifuge 1 min at 8,000 x g (10,000 rpm). Discard flow-through and place the NucleoSpin® Extract column back into the collecting tube.

OPTIONAL: Discard the flow-through, place the NucleoSpin® Extract column again into the collecting tube and add 500 µl buffer NT2. Centrifuge for 1 min at full speed (max. 11,000 x g, 14,000 rpm) and discard flow-through. This additional washing step is to optimize removal of inhibitors and contaminations resulting from agarose and is recommended, if sensitive subsequent reactions are to be performed.



1 min,
8,000 x g

- 6 Add 600 µl NT3. Centrifuge for 1 min at full speed (max. 11,000 x g, 14,000 rpm). Discard flow-through and place the NucleoSpin® Extract column back into the collecting tube.



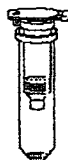
+ 600 µl NT3



1 min,
11,000 x g

- 7 Add 200 µl buffer NT3. Centrifuge for 2 min at full speed (max. 11,000 x g, 14,000 rpm) to remove NT3 quantitatively.

Residual ethanol from buffer NT3 would inhibit subsequent reactions and has to be removed in this step. In addition to centrifugation, total removal can be achieved by the incubation of NucleoSpin® Extract columns for 2-5 min at 70°C before elution.



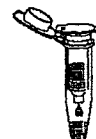
+ 200 µl NT3



2 min,
11,000 x g

- 8 Place the NucleoSpin® Extract column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 25-50 µl elution buffer NE, leave at room temperature for 1 min. Centrifuge for 1 min at full speed (max. 11,000 x g, 14,000 rpm).

Yield of larger fragments (> 5-10 kb) can be increased by using prewarmed elution buffer (70°C): For elution, add prewarmed elution buffer and leave for 1 min at room temperature before collecting eluate by centrifugation.



+ 25-50 µl NE



1 min,
11,000 x g

Annexe 3 :

Procedure

1. Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a starter culture of 2–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for ~8 h at 37°C with vigorous shaking (~300 rpm).

Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.

2. Dilute the starter culture 1/500 to 1/1000 into selective LB medium. For high-copy plasmids inoculate 25 ml or 100 ml medium. For low-copy plasmids, inoculate 100 ml or 500 ml medium. Grow at 37°C for 12–16 h with vigorous shaking (~300 rpm).

Use a flask or vessel with a volume of at least 4 times the volume of the culture. The culture should reach a cell density of approximately $3\text{--}4 \times 10^9$ cells per ml, which typically corresponds to a pellet wet weight of approximately 3 g/liter medium (see page 61).

3. Harvest the bacterial cells by centrifugation at $6000 \times g$ for 15 min at 4°C.

$6000 \times g$ corresponds to 6000 rpm in Sorvall GSA or GS3 or Beckman JA-10 rotors. Remove all traces of supernatant by inverting the open centrifuge tube until all medium has been drained.

⊗ If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at -20°C.

4. Resuspend the bacterial pellet in 4 ml or 10 ml of Buffer P1.

For efficient lysis it is important to use a vessel that is large enough to allow complete mixing of the lysis buffers. Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

5. Add 4 ml or 10 ml of Buffer P2, mix gently but thoroughly by inverting 4–6 times, and incubate at room temperature for 5 min.

Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. The lysate should appear viscous. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. After use, the bottle containing Buffer P2 should be closed immediately to avoid acidification from CO₂ in the air.

6. Add 4 ml or 10 ml of chilled Buffer P3, mix immediately but gently by inverting 4–6 times, and incubate on ice for 15 min or 20 min.

Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and SDS. The lysate should be mixed thoroughly to avoid localized potassium dodecyl sulfate precipitation.

7. **Centrifuge at $\geq 20,000 \times g$ for 30 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed in non-glass tubes (e.g., polypropylene). A centrifugal force of $20,000 \times g$ corresponds to 12,000 rpm in a Beckman JA-17 rotor or 13,000 rpm in a Sorvall SS-34 rotor. After centrifugation the supernatant should be clear.

Note: Instead of centrifugation steps 7 and 8, the lysate can be efficiently cleared by filtration using a QIAfilter Midi or Maxi Cartridge (see page 63).

8. **Re-centrifuge the supernatant at $\geq 20,000 \times g$ for 15 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

This second centrifugation step should be carried out to avoid applying suspended or particulate material to the QIAGEN-tip. Suspended material (causing the sample to appear turbid) can clog the QIAGEN-tip and reduce or eliminate gravity flow.

☞ Remove a 240- μ l or 120- μ l sample from the cleared lysate supernatant and save for an analytical gel (sample 1) in order to determine whether growth and lysis conditions were optimal.

9. **Equilibrate a QIAGEN-tip 100 or QIAGEN-tip 500 by applying 4 ml or 10 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.**

Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QIAGEN-tip to drain completely. QIAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.

10. **Apply the supernatant from step 8 to the QIAGEN-tip and allow it to enter the resin by gravity flow.**

The supernatant should be loaded onto the QIAGEN-tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be re-centrifuged or filtered before loading to prevent clogging of the QIAGEN-tip.

☞ Remove a 240- μ l or 120- μ l sample from the flow-through and save for an analytical gel (sample 2) in order to determine the efficiency of DNA binding to the QIAGEN Resin.

11. **Wash the QIAGEN-tip with 2 x 10 ml or 2 x 30 ml Buffer QC.**

Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow. The first wash is sufficient to remove all contaminants in the majority of plasmid DNA preparations. The second wash is particularly necessary when large culture volumes or bacterial strains producing large amounts of carbohydrates are used.

☞ Remove a 400- μ l or 240- μ l sample from the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).

12. Elute DNA with 5 ml or 15 ml Buffer QF.

Collect the eluate in a 10-ml or 30-ml tube. Use of polycarbonate centrifuge tubes is not recommended as polycarbonate is not resistant to the alcohol used in subsequent steps.

✎ Remove a 100- μ l or 60- μ l sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4).

⊗ If you wish to stop the protocol and continue later, store the eluate at 4°C. Storage periods longer than overnight are not recommended.

13. Precipitate DNA by adding 3.5 ml or 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at $\geq 15,000 \times g$ for 30 min at 4°C. Carefully decant the supernatant.

All solutions should be at room temperature in order to minimize salt precipitation, although centrifugation is carried out at 4°C to prevent overheating of the sample. A centrifugal force of $15,000 \times g$ corresponds to 9,500 rpm in a Beckman JS-13 rotor and 11,000 rpm in a Sorvall SS-34 rotor. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt-containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be more easily located. Isopropanol pellets are also more loosely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

14. Wash DNA pellet with 2 ml or 5 ml of room-temperature 70% ethanol, and centrifuge at $\geq 15,000 \times g$ for 10 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.

The 70% ethanol removes precipitated salt and replaces isopropanol with the more volatile ethanol, making the DNA easier to redissolve.

15. Air-dry the pellet for 5–10 min, and redissolve the DNA in a suitable volume of buffer (e.g., TE, pH 8.0, or 10 mM Tris-Cl, pH 8.5).

Redissolve the DNA pellet by rinsing the walls to recover all the DNA, especially if glass tubes have been used. Pipetting the DNA up and down to promote resuspension may cause shearing and should be avoided. Overdrying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best under slightly alkaline conditions; it does not easily dissolve in acidic buffers.

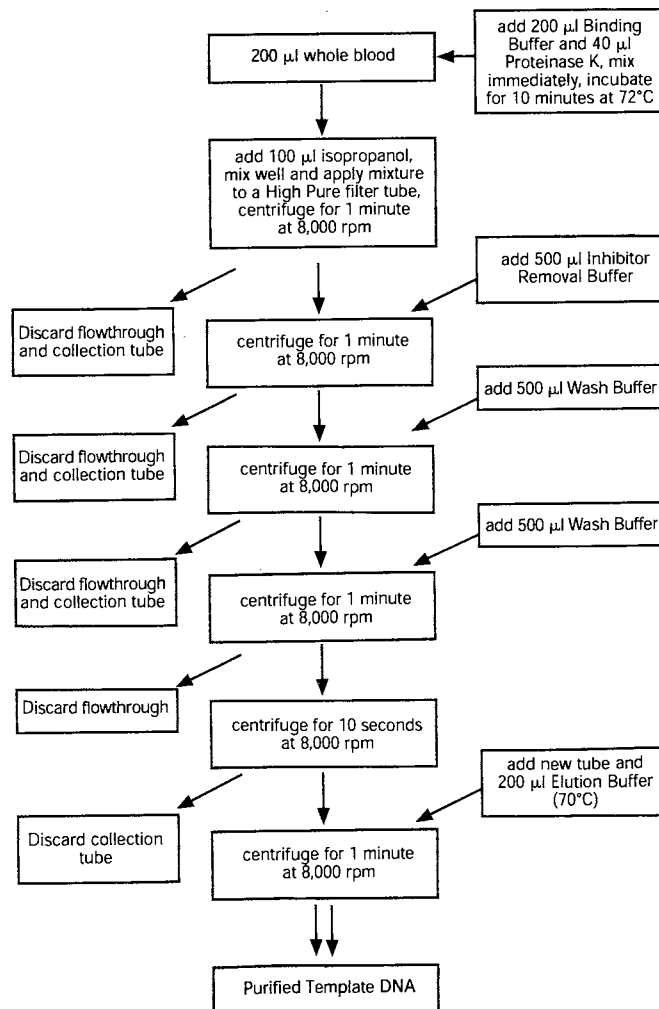
Determination of yield

To determine the yield, DNA concentration should be determined by both UV spectrophotometry and quantitative analysis on an agarose gel.

Agarose gel analysis

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be analyzed by agarose gel electrophoresis to determine at what stage of the purification procedure the problem occurred (see page 46).

Annexe 4 :

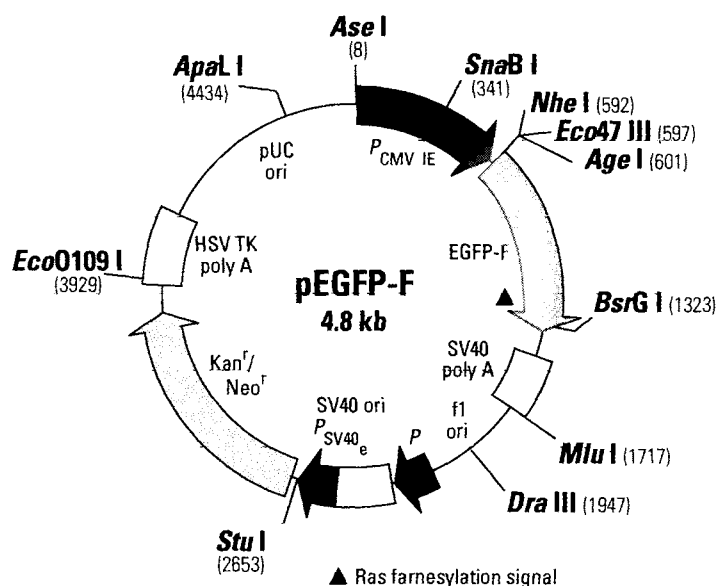


Annexe 5 :

1/1
atg cta tca ott ttt tot aag cca ccc cct ggt gcg gga tgt cgg atc gta gaa acg gtc
M L S L F S K P P P G A G C R I V E T V
61/21
cca gag aac tta ggc att acc aca cag cat atg cac acc cac gaa tgt ttc gac gaa ctc
P E N L G I T T Q H M H T H E C F D E L
121/41
atc act cag gcc aaa cga tac atc cac atc gcg tcg ttt tgt tgc aat ttg cgc aca acc
I T Q A K R Y I H I A S F C C N L R T T
181/61
gat caa gga aga ctg att atg aaa aaa ctt aaa gaa gct gca aaa tcc ggc gtc aga gtt
D Q G R L I M K K L K E A A K S G V R V
241/81
act atc tta gtg gat tat caa agc gga aac aag gac gaa gaa gaa tta ctc gaa agc aac
T I L V D Y Q S G N K D E E E L L E S N
301/101
gtc gaa tac att aag gta aag ata gga aaa cgg tac aac ccg ggg gta ctg ttg ggt agt
V E Y I K V K I G K R Y N P G V L L G S
361/121
ttc tgg atc gtc gac ggt aca cgg tgt tac ata gga aac gcg tcg ctt acg gga ggg tct
F W I V D G T R C Y I G N A S L T G G S
421/141
ata tcg aac ata aag aca ctg ggt gtc tac tcc aca tac gct ccc tta gcc gcg gat cta
I S N I K T L G V Y S T Y A P L A A D L
481/161
gaa cgt cgt ttt agc acg ttt aag gcc ttc aac gga aac aag tct atc cta tcc atc cta
E R R F S T F K A F N G N K S I L S I L
541/181
cac acg gcc tgt tgt ttg acg acg tot acg caa tat aac atc aat aat ccc ata gcc gga
H T A C C L T T S T Q Y N I N N P I G G
601/201
gtg ttt tta tca gat tcc ccc gat tac atg ctc ggg tgt tca agg acc ctc gac gcg gac
V F L S D S P D Y M L G C S R T L D A D
661/221
gtc gta ctg ggt aaa ata tcg aag gct aag aaa agc atc tgt ctg gaa ttg tta tct ctc
V V L G K I S K A K K S I C L E L L S L
721/241
gtg ccc gtg atc cga gaa gat gag aag act gtc tat tgg ccc aat att tac aac gag tta
V P V I R E D E K T V Y W P N I Y N E L
781/261
ata tgt gcg gcc atc aat cga ggc gtc aaa gtg aga ttg ttg ata gga tog tgg agc aac
I C A A I N R G V K V R L L I G S W S N
841/281
aac gac atc tac gtg atg tcg tcc gtg aag agt cta cag gcg atg tgt tog aac aac gat
N D I Y V M S S V K S L Q A M C S N N D
901/301
cta atc gtt aaa gtg ttt tac gat aag aac aat aca aaa ctc atg atc gtg gac gac gag
L I V K V F Y D K N N T K L M I V D D E
961/321
ttc gca cac att acc ccc gcg aac ttc gac ggt acg cat tat ctc cgt cac gcc ttc gtt
F A H I T P A N F D G T H Y L R H A F V
1021/341
agt ttt aat acg gtc cat ccg gaa ctc gta cac atg tta aat gcc ata ttc acg aga gat
S F N T V H P E L V H M L N A I F T R D
1081/361
tgg gaa aat ccc cgc aat acg gtg gta aaa aac tga
W E N P R N T V V K N *

codon
Acide aminé correspondant

Annexe 6 :



Restriction Map of pEGFP-F. All restriction sites shown are unique.

Description:

pEGFP-F encodes farnesylated enhanced green fluorescent protein, a modified form of EGFP that remains bound to the plasma membrane in both living and fixed cells. The vector contains the 20-amino-acid farnesylation signal from c-Ha-Ras (1, 2) fused to the C-terminus of EGFP. This farnesylation signal directs EGFP-F to the inner face of the plasma membrane.

pEGFP-F encodes a red-shifted variant of wild-type GFP (3–5) optimized for brighter fluorescence and higher expression in mammalian cells (excitation maximum = 488 nm; emission maximum = 507 nm). pEGFP-F encodes the GFPmut1 variant (6) which contains the double-amino-acid substitution of Phe-64 to Leu and Ser-65 to Thr. The coding sequence of the EGFP gene contains more than 190 silent base changes which correspond to human codon-usage preferences (7). Sequences flanking EGFP-F have been converted to a Kozak consensus translation initiation site (8) to further increase the translation efficiency in eukaryotic cells. The MCS in pEGFP-F is between the EGFP-F coding sequences and the SV40 poly A. SV40 polyadenylation signals downstream of the EGFP-F gene direct proper processing of the 3' end of the EGFP-F mRNA. The vector backbone also contains an SV40 origin for replication in mammalian cells expressing the SV40 T-antigen. A neomycin resistance cassette (Neo^r), consisting of the SV40 early promoter, the neomycin/kanamycin resistance gene of Tn5, and polyadenylation signals from the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV TK) gene, allows stably transfected eukaryotic cells to be selected using G418. A bacterial promoter upstream of this cassette expresses kanamycin resistance in *E. coli*. The pEGFP-F backbone also provides a pUC origin of replication for propagation in *E. coli* and an f1 origin for single-stranded DNA production.

Use:

EGFP-F is designed for use as a cotransfection marker. Because it remains attached to the plasma membrane, it can be detected by fluorescence microscopy in permeabilized cells after ethanol fixation (9). The vector can be transfected into mammalian cells using any standard transfection method. If required, stable transformants can be selected using G418 (10). The *Xba* I and *Bcl* I sites are methylated in the DNA provided by CLONTECH. If you wish to digest the vector with these enzymes, you will need to transform the vector into a *dam*[−] host and make fresh DNA.

Location of features:

- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589
Enhancer region: 59–465; TATA box: 554–560
Transcription start point: 583
C→G mutation to remove *Sac* I site: 569
- Farnesylated enhanced green fluorescent protein (EGFP-F) gene
Kozak consensus translation initiation site: 606–616
Start codon (ATG): 613–615; Stop codon: 1408–1410
Insertion of Val at position 2: 616–618
GFPmut1 chromophore mutations (Phe-64 to Leu; Ser-65 to Thr): 805–810
His-231 to Leu mutation (A→T): 1307
Last amino acid in wild-type GFP: 1327–1329
c-Ha-Ras farnesylation signal: 1345–1406
- MCS: 1414–1492
- SV40 early mRNA polyadenylation signal
Polyadenylation signals: 1625–1630 & 1654–1659; mRNA 3' ends: 1663 & 1675
- f1 single-strand DNA origin: 1722–2177 (packages the noncoding strand of EGFP)
- Bacterial promoter for expression of Kan^r gene
–35 region: 2239–2244; –10 region: 2262–2267
Transcription start point: 2274
- SV40 origin of replication: 2518–2653
- SV40 early promoter
Enhancer (72-bp tandem repeats): 2351–2422 & 2424–2494
21-bp repeats: 2498–2518, 2519–2539 & 2541–2561
Early promoter element: 2574–2580
Major transcription start points: 2570, 2608, 2614 & 2619
- Kanamycin/neomycin resistance gene
Neomycin phosphotransferase coding sequences:
Start codon (ATG): 2702–2704; stop codon: 3494–3496
G→A mutation to remove *Pst* I site: 2884
C→A (Arg to Ser) mutation to remove *Bss*H II site: 3230
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
Polyadenylation signals: 3732–3737 & 3745–3750
- pUC plasmid replication origin: 4081–4724

Primer Locations:

- EGFP-N Sequencing Primer (#6479-1): 679–658
- EGFP-C Sequencing Primer (#6478-1): 1266–1287

Propagation in *E. coli*:

- Suitable host strains: DH5 α , HB101, and other general purpose strains. Single-stranded DNA production requires a host containing an F plasmid such as JM109 or XL1-Blue.
- Selectable marker: plasmid confers resistance to kanamycin (30 μ g/ml) to *E. coli* hosts.
- *E. coli* replication origin: pUC; copy number: \approx 500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/ColE1

References:

1. Aronheim, A., *et al.* (1994) *Cell* **78**:949–961.
2. Hancock, J. F., *et al.* (1991) *EMBO J.* **10**:4033–4039.
3. Prasher, D. C., *et al.* (1992) *Gene* **111**:229–233.
4. Chalfie, M., *et al.* (1994) *Science* **263**:802–805.
5. Inouye, S. & Tsuji, F. I. (1994) *FEBS Letters* **341**:277–280.
6. Cormack, B., *et al.* (1996) *Gene* **173**:33–38.
7. Haas, J., *et al.* (1996) *Curr. Biol.* **6**:315–324.
8. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**:8125–8148.
9. Jiang, W. & Hunter, T. (1998) *BioTechniques* **24**:348–354.
10. Gorman, C. (1985) In *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. II, Ed. Glover, D. M. (IRL Press, Oxford, UK) pp. 143–190.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mlle SAMPIETRO Séverine, Stéphanie, Elisabeth
a été admis(e) sur concours en : 1995
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 juillet 2001
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, S. BERTAGNOLI, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle SAMPIETRO Séverine, Stéphanie, Elisabeth
intitulée :

"Construction d'un virus myxomateux délété de la protéine d'enveloppe MO22L"

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Docteur Stéphane BERTAGNOLI

**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



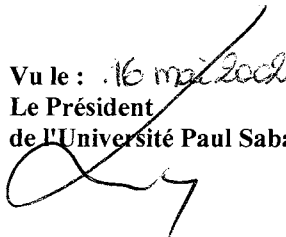
Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**

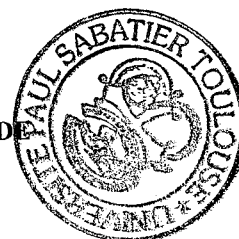


Professeur Henri DABERNAT

**Vu le : 16 mai 2002
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



Professeur Raymond BASTID



Bibliographie :

APPLEYARD, G. HAPEL, AJ and BOULTER, E : 1971. An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbit poxvirus ; J. Gen. Virol. 13 – p 9-17.

ARTHUR, CP : 1989. Diverses situations de la myxomatose en France. Office nationale de la chasse, pathologie du lapin de compagnie et des rongeurs domestiques.

ARTHUR, CP et LOUZIS, C : 1988. La myxomatose du lapin en France : une revue ; Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 7 – p 937-957.

BLASCO, R and MOSS, B : 1991. Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-dalton outer envelope protein. J. Virol. 65 – p 5910-5920.

BLASCO, R and MOSS, B : 1992. Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell to cell spread ; J. Virol. 66 – p 4170-4179.

BOULTER, GA and APPLEYARD, G : 1973. Differences between extracellular and intracellular forms of poxviruses and their implications ; Prog. Med. Virol. 16 – p 86-108.

BRUN ; SAURAT ; GILBERT ; GODARD et BOUQUET : Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose ; Rev. Med. Vet. 132 – p585-590

BULLER, RML et PALUMBO, G : 1991. Poxvirus pathogenesis ; Microbiol. Rev 55 – p 80-122.

BUTTNER, M et al : 1995. Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs ; Vet. Immuno. Immunopath. 46 – p 237-250

CACOULOS et BABLANIAN: 1991. Polyadenylated RNA sequences produced in vaccinia virus infected cells under aberrant conditions inhibit protein synthesis in vitro ; Virology 184 – p 747-751.

COLBY et DUESDERG : 1969. Double stranded RNA in vaccinia virus infected cells ; Natural 222 – p 940-944.

DALES et MOSBACH : 1968. Vaccinia as a model for membrane biogenesis ; Virology 35 – p 564-583.

DEVAUX ; BUCHHOLZ ; SCHNEIDER ; ESCOFFIER ; CATTANEO ; GERLIER : 1997. CD 46 short consensus repeat III and IV enhance measles virus binding but impair soluble hemagglutinin binding ; J. Virol. 71 – p 4157-4160.

DUBOCHET et al : 1994. Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. J. Virol. 68 – p 1935-1941.

ENGELSTAD, M and SMITH, G.L : 1993. The vaccinia virus 42 kDa envelope protein is required for envelopment and egress of extracellular virus and for virulence. 194 – p 627-637.

FARRAR et al : 1993. The molecular cell biology of interferon γ and its receptor ; Ann. Rev. Immuno. 11 – p 571-611.

FENNER et al : 1948. The clinical features and pathogenesis of mousepox ; J. Patho. Bacteriol 60 – p 529-552.

FENNER et RATCLIFFE : 1965. Myxomatosis ; Cambridge University press London.

FENNER et FANTINI : 1999. Biological control of vertebrate pests, the history of myxomatosis an experiment in evolution ; CABI publishing.

FENNER :1992. Vaccinia virus as a vaccine and poxvirus pathogenesis. Recombinant poxviruses. MM BINNS and GL SMITH editors, CRC press, BOCARATON FLORIOA p1-43.

FIELDS : 1993. Poxvirus and their replication in fundamental virology ; 2^{ème} édition, RAVEN press, NY.

FRANCKI et al : 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international comitte on taxonomy of viruses. Arch. Virol (supp 2) ; Springer Velog p450.

GERLIER : 1998. Entrée des virus enveloppés à l' echelle moléculaire. Virologie vol 2, n 3, mai-juin 1998 – p 215-226.

GERLIER et DEVAUX : 1997. CD 46 : un premier recpteur du virus de la rougeole ; Virologie 1 – p 321-330.

GRIFFITHS et al : 2001. Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus : isolated particle analysis ; Journal of virology Nov 2001 – p 11034-11055.

GRIFFITHS et al : 2001. Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus :thin-section analyses. Journal of virology Nov 2001 – p 11056-11070.

HOLLINSHEAD ; VANDERPLASSCHEN ; SMITH et VAUX : 1999. Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane ; J. of Virology, Fev 1999 – p 1503-1517.

HSIAO ; CHUNG et CHANG : 1998. A27 protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate ; J of Virology p 1577-1585.

HSIAO ; CHUNG et CHANG : 1999. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of IMV to cells ; J of Virology p 8750-8761.

ISCHIHASHI, Y : 1996. Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. Virology 217 – p 478-485.

JOHNSON et al. : 1993. An update on the vaccinia virus genome. Virology 196 – p 381-401.

JOUBERT et al. : 1972. La myxomatose tome I : expansion scientifique française.

KARUPIAH et al. : 1990. Elevated NK cell responses in mice infected with recombinant vaccinia virus encoding murine IL2. J. Immunol 144 – p 290-298.

KARUPIAH ET AL. : 1993. Inhibition of viral replication by interferon and induced nitric oxide synthetase. Science 261 – p 1445-1448.

KLOTZ, BARTOLDUS et STEGMANT : 1996. Membrane asymmetry is maintained during influenza-induced fusion. J. Biol. Chem. 271 – p 2383-2386.

KRIJNSE-LOCKER, J et al : 2000. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. Mol. Biol. Cell. 11 – p 2497-2511.

LAW et SMITH : 2001. Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. Virology 280 – p 132-142.

MARLIER et al : 2000. Study of the virulence of five strains of myxomatous myxoma virus in crossbred New Zealand White/Californian conventional rabbits, with evidence of long-term testicular infection in recovered animals. J. Comp. Pathol. 122 – p 101-113.

MAURIN : 1985. Caractères généraux des poxviridés en virologie médicale. Médecine Science Flammarion p 310-319.

MASTERS, J et al : 2001. Poxvirus infection rapidly activates tyrosine kinase signal transduction. The journal of biological chemistry. 276 – p 48371-48375.

Mc FADDEN at al : 1994. Poxvirus growth factors-in vivoceptors, virokines and related immune modulations encoded by DNA viruses. Ed. RG, Texas, Austin p 1-15.

Mc FADDEN et al : 1999. Use of chemokine receptors by poxviruses. Science 286 – p 1968-1971.

MILLER et al : 1995. Severe and prolonged inflammatory response to localized cowpox virus infection in footpads of C₅ deficient mice : investigation of the role of host complement in poxvirus pathogenesis. Cell. Immunol. 162 – p 326-332.

MOSS : 1991. Poxviridae and their replication. In fundamental vilrology. Second edition, FIELD B.n. and KNIPE J.M. Editors, raven Press, New-York.

MOSS : 1992. Molecular biology of Poxviruses in recombinant poxviruses. BINNS M.M. and SMITH G.L. Editors, CRC Press, Boca Rator – Florida p 45-80.

MULLER et al : 1994. Functionnal role of type 1 and 2 interferons in antiviral defense. Science 264 – p 1918-1921.

MURPHY : 1996. Classification and nomenclature of viruses :sixth report of the international comittee on taxinomy of viruses. Springer Verlag.

ODA, KI et SOKLIK : 1967. Hybridization and sedimentation studies on early and late vaccinia messenger RNA. J. Mol. Biol. 27 – p 395-419.

PAYNE and LG : 1980. Significance of extracellular enveloped virus in the “in vitro” and “in vivo” dissemination of vaccinia. J. Gen. Virol. 50 – p 89-100.

PAYNE , LG et KRISTENSSON K. : 1985 ; Extracellular release of enveloped vaccinia virus from mouse nasal epithelial cells in vivo. J. Gen. Virol. 66 – p 643-646.

PEDERSEN, K et al.: 2000. Characterization of vaccinia virus intracellular cores: implications for viral uncoating and core structure. J. Virol. 74 – p 3525-3536.

PEDLEY et COOPER : 1984. The inhibition of hela cell RNA synthesis following infection with vaccinia virus. J. Gen. Virol. 65 – p 1687- b1697.

PETIT F., BERTAGNOLI S. et BOUCRAUT-BARALON C. : 1997. Interactions entre les poxvirus et leurs hôtes. Rev. Med. Vet. 148 – p 3-18.

RAMSHAW et al. : 1992. Expression of cytokine by recombinant vaccinia viruses : a model for studying cytokine in virus infections in vivo. Immuno. Rev. 127 – p 157-182.

RODRIGUEZ, JF et SMITH, GL.: 1990. IPTG-dependent vaccinia virus: identification of a virus protein enabling virion envelopment by Golgi membrane and egress. Nucleic Acids Res. 18 – p 5347-5351.

ROSS, CYRKLAFF, CUDMORE, BLASCO R., KRIJNSE LOCKER et GRIFFITHS : 1996. a novel cryoelectromicroscopic approach to investigate the structure of the intracellular forms of vaccinia virus. EMBO. Journal 15 – p 2343-2355.

SANARELLI : 1898. Das Myxomatosegene virus-Bertrag Zum Stadium der Krankheitserreger ausser halb das sicht baren. Zbl bakt 23 – p 865-873.

SANDERSON CM, HOLLINSHEAD M et SMITH GL.: 2000. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. J. Gen. Virol. 81 – p 47-58.

SCHMELZ M., SODEIK B., ERICSSON M., WOLFFE E.J., SHIDA G.;HILLER G. et GRIFFITHS G. : 1993. Assembly of vaccinia virus : the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. J. Virol. 68 – p 130-147.

SEW et LENGYEL : 1992. The interferon system. J. Biol. Chem. 267 – p 585-589.

SIMMS et al. : 1998. cDNA expression cloning of the IC1 receptor, a member of immunoglobulin superfamily. Science 241 – p 585-589.

SMITH et MOSS : 1993. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 kpb of foreign DNA. Gene 25 – p 21-28.

SMITH : 1993. Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion S-glu. Virol. 74 – p 1725-1740.

SODEIK B., DONS R.W., ERICSSON M., HILLER G., MACHAMER C.E., VAN'T HOF W., VAN MEER G., MOSS B. et GRIFFITHS G. : 1993. assembly of vaccinia virus : role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the golgi stacks. Journal of Cell Biology 121 – p 521-541.

TOOZE J., HOLLISHEAD M., REIS B., KADSAK K. and KERN H. : 1993. Progeny vaccinia viruses and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes-Eur. J. Cell. Biol.60 – p 163-178.

VANDERPALSSCHEN A., HOLLINSHEAM M. and SMITH G.L. : 1997. Antibodies against vaccinia virus do not neutralize extracellular enveloped virus but prevent release from infected cells and comet formation. J. Gen. Virol. 78 – p 2041-2048.

VANDERPALSSCHEN A., HOLLINSHEAM M. and SMITH G.L. : 1998. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. J. Gen. Virol. 79 – p 877-887.

VANDERPALSSCHEN A., MATHEW E., HOLLINSHEAM M., SIM R. and SMITH G.L. : 1998. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement due to incorporation of host complement control proteins into envelope. Proc.Nat. Acad. Sci. U.S. A95 – p 7544-7549.

VANDERPALSSCHEN A. and SMITH G.L. : 1997. an novel virus binding assay using confocal microscopy : demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. J. Virol. 71 – p 4032-4041.

Toulouse, 2002

NOM : SAMPIETRO

PRENOM : Séverine

TITRE : Construction d'un virus myxomateux délété de la protéine d'enveloppe MO22L.

RESUME :

La myxomatose est une maladie infectieuse, contagieuse et transmissible touchant essentiellement le lapin européen. Elle est responsable de pertes économiques non négligeables et d'une forte mortalité dans les populations de lapins de garenne. Elle est due à un *Leporipoxvirus* (famille des *Poxviridae*) dont le génome est entièrement séquencé. Les poxvirus possèdent deux formes virales infectieuses : IMV (Intracellulaire Mature Virus) et EEV (Extracellular Enveloped Virus), qui présentent chacune des propriétés très différentes. Malheureusement, ces deux formes sont difficiles à isoler l'une de l'autre, et les études d'interaction hôte-virus sont ainsi difficiles à interpréter.

L'objectif de ce travail est de construire et de purifier un virus mutant délété du gène codant pour la protéine d'enveloppe MO22L, qui ne produira que des formes IMV. Ceci permettra, à terme, d'étudier les deux populations virales séparément.

MOTS CLEFS : Virus myxomateux, Poxvirus, Protéine d'enveloppe, virus mutant, Virologie.

TITLE : Construction of a myxoma virus deleted in MO22L envelop protein gene.

ABSTRACT:

Myxomatosis is an infectious and contagious disease mainly concerning the european rabbit. It is responsible for high economic losses and important mortality in the population of wild rabbits. It is due to a virus belonging to the *Poxviridae* family, *Leporipoxvirus* genus. Recently, its genome was completely sequenced. The poxvirus have two distincts infectious virion forms: Intracellular Mature Virus (IMV) and Extracellular Enveloped Virus (EEV). Unfortunately, because it's difficult to separate them *in vitro*, studies about virus-cells interactions are difficult to interpret.

The purpose of this thesis is to construct and to purify a mutant virus deleted in envelop protein MO22L gene. This mutant virus is supposed to produce only IMV forms. At term, this will allow to study separately the two viral populations.

KEY WORDS : Myxoma virus, Poxvirus, Envelop protein, mutant virus, Virology.